

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ÂNGELA IDALIA SOVINSKI

PERFIL GENOTÍPICO E FENOTÍPICO DA RESISTÊNCIA À  
ANTIMICROBIANOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM CADEIA PRODUTIVA  
DE CARNE SUÍNA.

PALOTINA

2019

ÂNGELA IDALIA SOVINSKI

PERFIL GENOTÍPICO E FENOTÍPICO DA RESISTÊNCIA À  
ANTIMICROBIANOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM CADEIA  
PRODUTIVA DE CARNE SUÍNA.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Animal, Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, área de concentração Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S729      Sovinski, Ângela Idalia  
            Perfil genotípico e fenotípico da resistência à antimicrobianos  
            de staphylococcus aureus em cadeia produtiva de carne suína  
            / Ângela Idalia Sovinski. – Palotina, 2019.  
            97f.

            Orientador: Luciano dos Santos Bersot  
            Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
            Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

            1. Multirresistência. 2. Carne suína. 3. Staphylococcus coagu-  
            lase positiva. I. Bersot, Luciano dos Santos. II. Universidade  
            Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -  
40001016077P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANGELA IDALIA SOVINSKI** intitulada: **Perfil Genotípico e Fenotípico da Resistência à Antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* em cadeia produtiva de carne suína**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 28 de Fevereiro de 2019.

LUCIANO DOS SANTOS BERSOT

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

VINICIUS CUNHA BARCELLOS

Avaliador Interno (UFPR)

MAIKE TAÍS MAZIERO MONTANHINI

Avaliador Externo (UFPR)

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

ANGELA IDALIA SOVISNKI, filha de Bernadete Sovinski e José Sovinski, nascida em 19 de novembro de 1977 no município de Curitiba, estado do Paraná. Médica Veterinária formada no ano de 2004 pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina (UFPR). Especialização em Higiene e Processamento de Produtos de Origem Animal pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Setor Palotina (2008-2010). Especialização em Saúde Pública pela Universidade Estadual do Paraná (UNIOESTE) – Cascavel/PR (2010-2011). Trabalha na Prefeitura Municipal de Cafelândia/PR, Setor de Defesa Sanitária Animal – Setor da Agricultura. Responsável Técnica da COAVE, unidade produtora de ovos comerciais e unidade de cria e recria de aves de postura comercial, localizada em Nova Aurora/PR. Responsável Técnica da Empresa Boniatti, produção de embutidos defumados, em Corbélia/PR. Mestranda do Programa de Pós graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na linha de pesquisa Microbiologia aplicada à Produção Animal.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a toda minha família, que mesmo distante sempre esteve comigo em pensamento e dentro de meu coração, mesmo nas horas de tristeza sei que eles sempre estão torcendo pelas minhas vitórias.

Em especial a minha Nona, Idalia Stella Carignano, pessoa muito batalhadora e que tenho como exemplo de força e serenidade, que sinto muita saudade devido à distância, mas sei que cada conquista minha, deixa ela muito feliz.

Dedico também a um a pessoa muito especial que vem me conquistando e apoiando nas minhas escolhas, alguém que passou a fazer parte de minha vida e meu motivo de colocar muito amor neste trabalho, ele é minha paixão, Júlio.



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus e Nossa Senhora pela proteção durante meus desafios e dificuldades que encontrei, renovando a cada dia minhas forças para continuar firme e seguir em frente, mesmo diante de tantas dúvidas e medos.

Aos meus pais, José e Bernadete, que sempre me apoiaram em tudo que busco alcançar para melhorar meus conhecimentos, me apoiando e mandando boas vibrações, pois a distância é um fardo que pesa muito. Aos meus irmãos Tânia, Cleverson e Tatiane pelo carinho e companheirismo que temos e é fruto do amor que nossos pais nos deram durante nossa criação e educação. Ao meu marido Júlio pelo apoio, pela enorme paciência nos momentos de medo, por entender a ausência nos momentos em que foi necessária dedicação aos estudos, obrigado pelo carinho que me conforta e da força para continuar mesmo com tantas dificuldades.

Agradeço ao Dr. Tahira, meu primeiro orientador e mestre, o qual me inspirou a cursar veterinária e ir atrás de meus sonhos.

A minha mãe de coração Dona Zenaide Claus, quem eu amo incondicionalmente, que tenho muito a agradecer pelo apoio e pelas acolhidas quando precisei permanecer em Palotina.

Às amigas Elter (meu presente de Deus como irmã de coração), Andressa, Jaqueline, Cibely, que mesmo cada uma correndo atrás dos próprios objetivos, sempre estiveram de alguma forma me apoiando. Somos prova de que a amizade verdadeira pode resistir anos, mesmo com distância e falta de tempo.

Agradeço também à técnica Rosana, que muitas vezes me socorreu em meio ao desenvolvimento do trabalho, obrigada por toda ajuda e pela amizade, e aos demais colegas de laboratório.

Aos residentes Carolina, Thiago, Emanuely e ao mestrando Leonardo agradeço por toda ajuda e paciência, muito obrigado vou levar vocês sempre no coração. Deixo um agradecimento muito especial a Carolina, pessoa de muita luz, pois foi com sua ajuda em especial na parte da biologia molecular, que foi possível desenvolver o projeto, minha eterna gratidão.

Um agradecimento especial ao Professor Luciano dos Santos Bersot pelo convite e orientação no mestrado. Obrigada pela importante contribuição ao longo de todo esse tempo para minha formação profissional e construção

pessoal. Ao LACOMA e à Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina pela oportunidade de aprendizagem e crescimento profissional nesta etapa de minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela parceria no projeto e por disponibilizar o laboratório e tudo o que foi necessário para a realização de importantes etapas desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG por viabilizar a execução do projeto através do financiamento concedido via chamada conjunta de projetos FAPEMIG/EMBRAPA (CVZ-APQ-03166-13), Edital 11/2013.

À todos muito obrigada!



*“Agradeço todas as  
dificuldades que  
enfrentei; não fosse por elas,  
eu não teria saído do lugar.  
As facilidades nos  
impedem de  
caminhar. Mesmo as críticas  
nos auxiliam muito.”*

Francisco Cândido Xavier

## RESUMO

A carne suína é a mais consumida no mundo e uma importante fonte de proteína. Neste cenário o Brasil é o quarto produtor mundial e o Paraná está como terceiro produtor nacional. O sistema de confinamento é o principal meio de criação na região Sul, que é dividido em unidade produtora de leitões e de terminação, sendo responsável por suprir grande parte da demanda de carne. Este modelo é um importante meio de disseminação de patógenos. Entre os diversos patógenos, está *Staphylococcus aureus*, que é responsável por diversos problemas clínicos na suinocultura e em humanos. Este micro-organismo possui natureza ubíqua sendo considerado um indicador de higiene na indústria de alimentos. O *S. aureus* pode causar doenças transmitida por alimentos (DTA), pela produção de enterotoxinas. Atualmente cepas resistentes à meticilina (MRSA) e vancomicina (VRSA), responsáveis por casos de infecções nosocomiais são as mais estudadas já que o MRSA está disseminado em ambientes extra hospitalares e tem sido isolado de vários animais domésticos, inclusive suínos. Deste modo, o objetivo do presente projeto foi rastrear a contaminação de *S. aureus* resistente a diferentes antimicrobianos na cadeia produtora de suínos. Foram identificados possíveis focos de contaminação durante o processo. O estudo foi conduzido em granjas de terminação de suínos e em abatedouro localizados no extremo oeste do Paraná. Com os resultados, obtivemos dados da contaminação nas etapas de produção, bem como identificação da disseminação de cepas de MRSA e o perfil de resistência para antimicrobianos da região estudada. Dez granjas de criação de suínos (terminação) e um frigorífico foram selecionados para coleta de 540 amostras ao longo da cadeia produtiva de carne suína, que foram submetidas a enumeração de SCP e *S. aureus*, e posterior isolamento e identificação molecular de *S. aureus*. A contaminação por *Staphylococcus aureus* foi dentro do limite aceitável ( $<2 \log \text{ UFC/cm}^2$ ) em 530 (98,1%) amostras, entre 2 e 3 logs  $\text{UFC/cm}^2$  em 2 (0,4%) amostras, entre 3 e 4 logs  $\text{UFC/cm}^2$ , em 1 (0,2%) amostras e superior a 5 logs  $\text{UFC/cm}^2$  7 (1,3%) das amostras. Contagens superiores a 4 log  $\text{UFC/cm}^2$  foram observadas em baias de terminação e pocilgas de espera. A enumeração de SCP foi possível em 20 (25%) isolados, sendo três (%) referente ao piso da baia na granja, 10 (1,8%) foi obtida da pocilga de espera no abatedouro e sete (1,3%) das amostras de carcaça após a sangria. Considerando as diferentes etapas de processamento, não foram observadas isolados SCP entre as demais amostras obtidas no ambiente de processamento e nos produtos finais. Um total de 20 isolados de SCP foram selecionados e caracterizados quanto ao perfil bioquímico, porém apenas 18 confirmaram a presença do gene *femA* para identificação de *S. aureus*. Assim, 18 isolados de *S. aureus* foram submetidos a caracterização de seus perfis de resistência em relação a 10 antimicrobianos, por testes de susceptibilidade e pela pesquisa de genes relacionados a resistência. Considerando os resultados fenotípicos, 100% dos isolados de *S. aureus* apresentaram resistência a sulfamethoxazole (SUL), a penicilina (PEN), a eritromicina (ERI) e a tetraciclina (TET); 94,40% a ciprofloxacina (CIP) e ao cloranfenicol (CLO); 88,8% a gentamicina e 16,6% a oxacilina (OXA), todos apresentaram sensibilidade a rifampicina (RIF) à vancomicina (VAN). Os 18 isolados foram resistentes a todos os antimicrobianos testados, sendo que três dos isolados (pocilga e carcaça) a oito antimicrobianos, 13 (baias, pocilgas e carcaças) apresentaram resistência a sete antibióticos, um referente a pocilga

de espera foi resistente seis antimicrobianos e um isolado da carcaça foi a quatro antimicrobianos; o perfil de resistência a PEN-GEN-ERI-TET-CIP-SUL-C foi o que apresentou maior frequência entre os isolados de *S. aureus* (n = 13). Em relação aos genes relacionados a resistência a diferentes antimicrobianos, 100% dos isolados de *S. aureus* apresentaram resultados positivos para *blaZ* (PEN), 22,2% para *femB* (OXA); para gene *mecA* (OXA) 50% dos isolados; não foram observados resultados positivos para *tetK* (TET), *vanA* (VAN) e *mecC* (OXA). Entre os isolados de *S. aureus*, três não apresentaram nenhum dos genes pesquisados, quatro apresentaram apenas um dos genes isolados (*blaZ*, *femB* e *mecA*), cinco apresentaram simultaneamente os genes *mecA-blaZ*, cinco somente para o gene *blaZ*, e um os genes *femB-blaZ*. Os resultados obtidos demonstram a presença de SCP e *S. aureus* apenas nas etapas iniciais de produção, importante por se tratar de um indicador de manipulação e higiene dentro da cadeia produtiva de carne suína. Também verificamos a presença de cepas com multirresistência e heterorresistencia aos diferentes antimicrobianos testados, bem como a confirmação e cepas MRSA dentro dos isolados além da presença de heterorresistencia entre os isolados, mostrando a importância do monitoramento microbiológico por metodologias fenotípicas e moleculares.

Palavras-chave: Multirresistência, carne suína, *Staphylococcus coagulase* positiva

## ABSTRACT

Pork is the most consumed in the world and an important source of protein. In This scenario, Brazil is the fourth World producer and Paraná is the third national producer. The confinement system is the main means of creation in the southern region, which is divided into piglets and finishing units, being responsible for supplying much of the meat demand. This model is an important means of dissemination of pathogens. Among the various pathogens, *Staphylococcus aureus* is responsible for several clinical problems in swine farming and humans. This microorganism has a ubiquitous nature being considered an indicator of hygiene in the food industry. *S. aureus* can cause food-borne diseases (DTA) by the production of enterotoxins. Currently, Methicillin-resistant (MRSA) and vancomycin (VRSA) strains, responsible for nosocomial infections are the most studied, since MRSA is disseminated in extra-hospital environments and has been isolated from several domestic animals, including Pigs. Thus, the objective of this project was to trace the contamination of *S. aureus* resistant to different antimicrobians in the pig-producing chain. Possible outbreaks of contamination Were identified during the process. The study was conducted in pig and slaughterhouse finishing farms located in the extreme west of Paraná. With the results, we obtained data from contamination in the stages of production, as well as identification of the dissemination of MRSA strains and the resistance profile for antimicrobians. Ten Pig Breeding Farms (finishing) and one refrigerator were selected to collect 540 samples along the pork production chain, which were subjected to the enumeration of SCP and *S. aureus*, and posterior isolation and molecular identification of *S. Aureus*. Contamination by *Staphylococcus aureus* was within the acceptable limit ( $< 2 \log \text{ UFC/cm}^2$ ) in 530 (98.1%) samples, between 2 and 3 logs  $\text{UFC/cm}^2$  in 2 (0.4%) samples, between 3 and 4  $\text{UFC/cm}^2$  logs, in 1 (0.2%) samples and more than 5 logs  $\text{UFC/cm}^2$  7 (1.3%) of the samples. Counts greater than 4  $\log \text{ UFC/cm}^2$  were observed in finishing bays and waiting pig stable equipment. The SCP enumeration was possible in 20 (25%) isolated, three (%) regarding the floor of the bay in the farm, 10 (1.8, 1%) was obtained from the waiting pigsty in the slaughterhouse and seven (1.3%) of the carcass samples after sangria. Considering the different processing stages, no SCP isolates were observed between the other samples obtained in the processing environment and in the final products. A total of 20 SCP isolates were selected and characterized as to the biochemical profile, but only 18 confirmed the presence of the *femA* gene for identification of *S. aureus*. Thus, 18 isolates of *S. aureus* were subjected to characterization of their resistance profiles in relation to 10 antimicrobians, by susceptibility tests and by the research of genes related to resistance. Considering the phenotypic results, 100% of the *S. aureus* isolates showed resistance to sulfamethoxazole (SUL), penicillin (PEN), erythromycin (ERI) and tetracycline (TET); 94.40% ciprofloxacin (CIP) and chloramphenicol (CLO); 88.8% to gentamicin and 16.6% to oxacillin (OXA), all presented sensitivity to rifampicin (RIF) to vancomycin (VAN). The 18 isolates were resistant to all antimicrobials tested, and three of the isolates (pigsty and carcass) to eight antimicrobials, 13 (bays, pig stable equipment and carcasses) showed resistance to seven antibiotics, one referring to the waiting pigsty was resistant six antimicrobials and one isolate of the carcass was to four antimicrobials; The resistance profile to PEN-GEN-ERI-TET-CIP-SUL-C was the

one that presented the highest frequency among *S. aureus* isolates (n = 13). In relation to the genes related to resistance to different antimicrobials, 100% of the isolates of *S. aureus* presented positive results for *blaZ* (PEN), 22.2% for *femB* (OXA); For *mecA* gene (OXA) 50% of the isolates; No positive results were observed for *tetK* (TET), *vanA* (VAN) and *mecC* (OXA). Among the isolates of *S. aureus*, three did not present any of the studied genes, four presented only one of the isolated genes (*blaZ*, *femB* and *mecA*), five simultaneously presented the *mecA-blaZ* genes, five only for the *blaZ* gene, and one the *femB-blaZ* genes. The results obtained demonstrate the presence of SCP and *S. aureus* only in the initial stages of production, important because it is an indicator of manipulation and hygiene within the production chain of pork. We also verified the presence of strains with multidrug resistance and heteroresistance to the different antimicrobials tested, as well as confirmation and MRSA strains within the isolates, besides the presence of Heteroresistencia among the isolates, showing the Importance of microbiological monitoring by phenotypic and molecular methodologies.

Keywords: multiresistance, swine meat, *Staphylococcus* coagulase positive

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática de carcaça suína antes (A) e após (B) a separação durante o abate, com indicação dos locais a serem amostrados com auxílio de esponjas estéreis em áreas delimitadas em 100 cm <sup>2</sup> (quadrados pontilhados) .....	49
FIGURA 2 - Amplificação do gene <i>femA</i> com produto de 132pb: (A) amostras de 1-17, (B) amostras de 18-20.....	60

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Produção, crescimento e comércio mundial de carnes .....	23
QUADRO 3 - Produção e consumo de carne suína, 2018 .....	24
QUADRO 3 - Produção mundial por tipo de carne (mil toneladas) .....	25
QUADRO 4 - Produção e consumo das principais carnes no Brasil, 2018 .....	25



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Amostras a serem coletadas no presente estudo, considerando etapas de criação, abate e processamento, com indicação da metodologia de amostragem, e metas a serem atingidas quanto às quantidades .....	48
TABELA 2 - Antibióticos e as concentrações utilizadas em ensaios de identificação de resistência por isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos em cadeia produtiva de carne suína por meio da metodologia do breakpoint.....	52
TABELA 3 - Genes pesquisados, sequências de nucleotídeos dos primers e características das reações de PCR utilizadas para identificação de <i>S. aureus</i> e definição do perfil de resistência a antibióticos em isolados de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> obtidos na cadeia produtiva de carne suína.....	53
TABELA 4 - Faixas de contaminação e frequência de <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> (SCP) e confirmação de <i>S. aureus</i> em amostras obtidas na cadeia produtiva de carne suína, Paraná, Brasil.....	57
TABELA 5 - Frequência de resistência a diferentes antimicrobianos e presença de genes relacionados a resistência a diferentes antimicrobianos em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos em diferentes etapas da cadeia produtiva de carne suína, Paraná, Brasil. ....	62
TABELA 6 - Correlação entre resultados fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos do <i>Staphylococcus aureus</i> .....	66
TABELA 7 - `Perfil de resistência a diferentes antibióticos por 18 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos da cadeia produtiva de carne suína. Resultados fenotípicos obtidos por teste de susceptibilidade considerando as concentrações indicadas para o <i>Breakpoint</i> (CLSI 2016) .....	67
TABELA 8 – Perfil genotípico por genes associados a resistência a diferentes antibióticos em 18 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos da cadeia produtiva de carne suína.....	69

## ANEXOS

1 - Amplificação do gene <i>tetK</i> com produto de 360pb .....	94
2 – Amplificação do gene <i>vanA</i> com produto de 399pb .....	95
3 – Amplificação do gene <i>mecC</i> com produto de 138pb .....	96
4 – Amplificação do gene <i>blaZ</i> com produto de 516pb .....	96
5 – Amplificação do gene <i>femB</i> com produto de 651pb .....	97
6 – Amplificação do gene <i>mecA</i> com produto de 533pb .....	97

## LISTA DE SIGLAS

ABIEC	- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
ABPA	- Associação Brasileira de Proteína animal
BNDES	- Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CDC	– Centers for Disease Control and Prevention
CIP	– Ciprofloxacino
CLO	– Cloranfenicol
DTA	– Doença Transmitida por Alimento
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EE	- Enterotoxina
ECDC	– <i>European Center for Disease Control</i>
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERI	- Eritromicina
EUA	– Estados Unidos da América
GEN	- Gentamicina
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MFS	– <i>Major facilitator superfamily</i>
MRSA	- <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NaCl	– Cloreto de Sódio
ORSA	- <i>Oxacillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
OXA	– Oxacilina
PEN	– Penicilina
PBP	– <i>Protein binding penicilin</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RIF	- Rifampicina
RPFA	– Ágar fibrinogênio plasma de coelho
SCP	– Staphylococcus coagulase positiva
SUL	- Sulfamethoxazole
TET	– Tetraciclina
UFC	– Unidade Formadora de colônia
USDA	- Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
VAN	– Vancomicina
VISA	– <i>Staphylococcus aureus</i> intermediário para vancomicina

- VRE - Enterococo resistente à vancomicina
- VRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina
- WHO - World Health Organization

## SUMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>23</b>
2.1 PRODUÇÃO E CONSUMO DE CARNE SUÍNA .....	23
2.2 CRIAÇÃO, ABATE E CONTAMINAÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS SPP. EM CANE SUÍNA .....	26
2.3 <i>Staphylococcus</i> spp.....	32
2.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> e antimicrobianos na suinocultura .....	36
2.3.2 Resistência e multirresistência a antimicrobianos .....	39
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>47</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
4.1 LOCAL DE ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS .....	47
4.2 CONTAGEM DE <i>SRTAPHYLOCOCCUS COAGULASE</i> POSITIVA E CONFIRMAÇÃO DO <i>S. AUREUS</i> .....	50
4.3 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENITÍPICA DAS CULTURAS DE <i>S. AUREUS</i> QUANTO A RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS .....	51
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
5.1 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS – PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO.....	59
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A carne suína é a segunda proteína animal mais consumida no mundo, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e possui papel importante na cadeia de carne mundial, em 2018 o consumo per capita no Brasil foi de 15,1 kg, permanecendo na terceira colocação entre os principais produtos cárneos consumidos no país.

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2018 o principal estado produtor foi Santa Catarina, com 900,5 mil toneladas, seguido do Rio Grande do Sul, com 713,6 mil toneladas e em terceiro lugar, o Paraná, com 542,3 toneladas, onde os animais são criados predominantemente em regime de confinamento, dividido em “sistema de ciclo completo” e “sistema com múltiplos locais”. Esse último sistema de produção é responsável por suprir grande parte da demanda de carne, cujo manejo sanitário e a biossegurança são fundamentalmente importantes para o controle da disseminação de patógenos de importância em saúde pública.

Com uma alta prevalência de agentes patogênicos em produtos alimentícios de consumo humano, a ocorrência de casos e surtos são frequentes, podendo resultar em hospitalizações e óbitos, fazendo com que os agentes patogênicos causadores das toxi-infecções alimentares tenham destaque como um grande problema em saúde pública. Dessa maneira, para garantir a produção de alimentos seguros, é fundamental a implantação de sistemas que melhorem a obtenção de matérias primas livres de patógenos sendo também uma exigência dos órgãos oficiais de saúde.

Entre as diversas espécies, *Staphylococcus aureus*, é a principal deste gênero, responsável por diversos problemas clínicos na suinocultura que incluem doenças no aparelho locomotor, infecções no trato gastrointestinal, infecções no trato urinário, cardiorrespiratório, endocardite, pleurite, doenças da pele, abscessos diversos, doenças reprodutivas, otites entre outras patologias. Responsável também por causar problemas em animais de outros setores da pecuária uma vez que possui natureza ubíqua, sendo também um patógeno oportunista em humanos e um indicador de problemas higiênico-operacional na indústria de processamento de alimentos. Na literatura, há descrito uma grande variedade de problemas e manifestações clínicas em suínos acometidos por

*Staphylococcus*, como doenças do aparelho locomotor, gastrointestinal, cardiorrespiratório, problemas dermatológicos, abscessos, reprodutivos entre outros (MENIN et al., 2008).

A intoxicação alimentar provocada por *S. aureus* caracteriza-se pela produção de enterotoxinas pré-formadas no alimento, sendo esta a 3ª maior causa de toxi-infecção alimentar no Brasil com 7.170 surtos de doença transmitida por alimentos (DTA) registrada pelo Ministério da Saúde no período entre 2007 e 2017.

Adicionalmente, relata-se historicamente a multirresistência de estirpes de *S. aureus* a antibióticos como penicilinas, meticilina MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e vancomicina VRSA. Atualmente cepas resistentes à MRSA e VRSA, são responsáveis por casos de infecções nosocômiais e tornaram-se as mais estudadas já que estão disseminadas em ambientes extra hospitalares e tem sido isolada de vários animais domésticos, inclusive em suínos (GELATTI et al., 2009).

*S. aureus* MRSA é uma das principais causas de infecção em humanos, e está bem documentado o acometimento desta bactéria em indivíduos hospitalizados. Porém, o relato de colonização e infecção de indivíduos na comunidade, sem contato prévio com o ambiente hospitalar, sugere outras fontes de contaminação, como o emprego de fármacos na pecuária, o que induz a colonização por MRSA em animais de produção e consequente contaminação de produtos cárneos.

A incidência de animais domésticos portadores e/ou infectados com MRSA tem sido descrita com frequência em vários países e acometendo diversas espécies. Como consequência da colonização e/ou infecção por estas bactérias, em animais de produção, destaca-se a dificuldade na terapêutica das infecções, desde que comumente além dos beta-lactâmicos, a grande maioria das estirpes MRSA possui outros determinantes de resistência tais como: aos aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, fluoroquinolônicos entre outros.

Outro importante aspecto dos MRSA em animais é a possibilidade de contaminação dos produtos cárneos destinados ao consumo. Estudos recentes relatam o isolamento de linhagens destes micro-organismos em alimentos de origem animal, incluindo carne suína, gado bovino, frango, entre outros, além de queijo bovino, leite e seus derivados. Os MRSA de origem animal também se



destacam como causa de infecções em indivíduos que trabalham com as espécies animais que se encontram infectadas ou colonizadas por essas cepas.

Dentre as espécies de animais domésticos, os suínos têm sido apontados como importantes reservatórios de cepas MRSA, despertando pesquisas que buscam melhor compreender a epidemiologia da transmissão e evolução da resistência antibiótica destes micro-organismos entre humanos e animais.

Deste modo, o objetivo do presente projeto foi rastrear a contaminação de *S. aureus* na cadeia produtiva de suínos, com identificação de possíveis pontos de contaminação, e o seu perfil de resistência a antimicrobianos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUÇÃO E CONSUMO DE CARNE SUÍNA

A carne suína ocupa o segundo lugar no ranking das carnes mais produzidas e consumidas em todo o mundo, como pode ser observado no Quadro 1. Nos últimos dez anos, a produção mundial de carne suína cresceu, em média, 1,8% a.a., percentual superior ao verificado, no mesmo período, em carne bovina (0,6% a.a.), mas inferior ao ocorrido em pescados (2,5% a.a.) e em carne de frango (4,2% a.a.) (UDSA, 2019).

QUADRO 1 - Produção, crescimento e comércio mundial de carnes (mil ton.)

Carnes	Produção	Taxa de cresc. anual 2008-2018 (%)	Exportações	Participação exp./ produção (%)
Pescados	167.285	2,5	36.339	22,3
Carne suína	110.321	1,8	8.128	7,2
Carne de frango	91.168	4,2	10.273	12,2
Carne bovina	65.353	0,6	10.212	17,1

FONTE: USDA (2019)

As aves e suínos lideram a produção mundial de carnes, representando juntas mais de 72,0% de toda a carne produzida mundialmente (Figura Y). Devemos ter uma exportação muito superior do que as quase 600 mil toneladas de 2018 (UDSA, 2019). Infelizmente o envio de carne suína para outros países

foi menor no ano passado em relação a 2017, mas em 2019 apresenta ter patamares muito mais positivos. Como ainda dependemos de verificar o panorama global, principalmente o de importação de carne suína da China, ainda não se fala em números. Mas se não houver nenhum episódio diferente, o Brasil deve ter crescimento entre 2% e 5% nos embarques de carne suína (USDA, 2019).

O Brasil segue como o quarto maior produtor e exportador mundial, porém continua muito atrás dos três maiores produtores China, União Europeia e Estados Unidos, (Quadro 2), sendo este um reflexo da forte concorrência e da dificuldade de acesso do produto aos principais mercados (USDA, 2019).

QUADRO 2 - Produção e consumo de carne suína - 2018 (mil ton.)

Países	Produção	Participação (%)	Taxa de cresc. anual 2008-2018 (%)	Consumo	Participação (%)
China	54870	49,7	1,6	55668	50,7
UE	23290	21,1	0,7	20974	19,1
USA	11121	10,1	2,6	9370	8,5
Brasil	3529	3,2	4,2	2893	2,6
Rússia	2615	2,4	4,4	3016	2,7
Outros	14961	13,6	1,1	17924	16,3
Total	110376	100	1,6	109845	100

FONTE: USDA (2019)

As estimativas do USDA para as exportações de carne suína – equivalente em carcaça – em 2019, apresentaram uma redução de cerca de 0,5% em relação a 2018. Destaca-se a forte queda das exportações oriundas da União Europeia, da ordem de 10% afetadas, sobretudo, pela queda das importações pela China. Cabe destacar a redução das importações pela China em 2018, de cerca de 24% em relação a 2017. E com as recentes normas sanitárias adotadas pelo governo chinês, muitos pequenos produtores brasileiros não conseguiram se ajustar, levando-os a ofertar elevada quantidade de suínos vivos no mercado, sendo que esse excesso de oferta impactou negativamente as importações de carne suína em especial pela China (BNDES, 2018).

O quadro 3 destaca os dados de produção, em milhões de toneladas de equivalente carcaça por tipo de carne produzida em 2018, segundo USDA 2019.

QUADRO 3: produção mundial por tipo de carne (mil toneladas).

Tipo	Milhões de toneladas	%
Aves	121,6	36,3
Suínos	120,6	36,0
Bovinos	72,2	21,6
Ovinos	15,0	4,5
Outros	5,6	1,7

FONTE: USDA, 2019.

Em relação ao consumo *per capita*, com base em dados para 2018 da *National Pork Board* (2018), os maiores consumidores de carne suína são China/Hong Kong/Macau e UE, ambos com consumo ligeiramente superior a 40 kg/ano. Nos EUA o consumo é de 29,2 kg/ano, perante 21,2 kg/ano na Rússia e 15,1 kg/ano no Brasil (ABPA, 2018). De uma forma geral, o consumo de carne suína no mundo tem se expandido mais aceleradamente nos países emergentes, enquanto nos desenvolvidos segue de maneira relativamente estável.

Em 2018, o Brasil produziu pouco mais de 3,5 milhões de toneladas (Quadro 4), o que representou cerca de 3% do total mundial (USDA, 2019). Já em relação às exportações, o Brasil respondeu, neste mesmo ano, por aproximadamente 9% do total mundial em volume, como mostrou o mesmo quadro.

Quadro 4 - Produção e consumo das principais carnes no Brasil, 2018 (mil ton.)

Carnes	Produção	Consumo
Carne de frango	13146	9309
Carne bovina	9425	7781
Carne suína	3519	2893
Pescados*	1329	2367

FONTE: USDA (2019) / FAO. \*pescado valor estimado para 2018 (inclui consumo humano e não humano).

A região Sul do Brasil concentrou em 2017 67% dos abates com inspeção nos três níveis de fiscalização (federal, estadual ou municipal). A região Sudeste

e Centro-Oeste responderam, naquele mesmo ano, por 18%, e, por 14% respectivamente. As regiões Norte e Nordeste apresentaram apenas 1%. Santa Catarina se destaca dentre os estados da federação, com 27% do total, Rio Grande do Sul e Paraná, contabilizam 20% cada (BARRETO *et al.*, 2017).

Em relação ao consumo, a carne suína é a terceira mais consumida no país, sendo o mercado interno o principal destino da produção do setor, respondendo por cerca de 85% da demanda, em 2018. Atualmente a média de consumo nacional é semelhante à mundial, em torno de 15 kg/habitante/ano, e tem crescido nos últimos dez anos, quando saiu de 11,6 para os atuais 15,1 (ABPA, 2018), representando um aumento de 30% no período. Esse crescimento no consumo da carne suína foi maior que nas demais carnes no mesmo período, pois o consumo da carne de frango cresceu 22% – de 35,5 kg/per capita/ano para 41,1 (ABPA, 2018) – e a bovina caiu quase 8% – de 41,9 para 36,5 kg/habitante/ano (ABIEC, 2018).

Essa maior elevação do consumo, ocorrida na última década, foi provocada não só pelo aumento do poder de compra das camadas mais pobres da população no período, que aumentou o consumo geral de carnes, mas, sobretudo, pela redução do preço relativo da carne suína diante da bovina e da de frango no Brasil.

## 2.2 CRIAÇÃO, ABATE E CONTAMINAÇÃO *STAPHYLOCOCCUS* SPP. EM CARNE SUÍNA

As Unidades Produtoras de Leitões (UPL) produzem os leitões, onde ali permanecem por cerca de 65 dias, até adquirirem um peso médio de 24,5 kg. Nessa etapa, já foi selecionado o material genético que irá compor o plantel, definidas as boas práticas na alimentação e no manejo dos animais. Depois desta fase, os leitões são encaminhados para a Unidades de Terminação (UT), onde receberão os cuidados necessários durante cerca de 120 dias, a fim de atingir o peso de abate, aproximadamente 100 - 130 kg (SANTOS, 2011). A última etapa realiza-se com o recebimento dos suínos para abate pela agroindústria.

O suíno chega ao frigorífico, geralmente no anoitecer, e é alojado em uma área própria para descansar do trajeto, dispondo apenas de água. Na manhã

seguinte, dá-se início ao abate. O animal após insensibilização segue em trilhos aéreos até a área de sangria, depois para a escaldagem, depiladeira e chamuscador (SANTOS, 2011). Em seguida, as carcaças serão submetidas à limpeza, saindo da área suja e entrando na área limpa para a evisceração, serragem, toaletes, lavagem final e frigorificação.

A próxima etapa, denominada espotejamento, a carne recebe cortes específicos e direciona-se para a embalagem, onde será devidamente identificada. Na etapa de embalagens estas são acondicionadas sobre pallets em túnel de frio apropriados até a comercialização (SANTOS, 2011).

Durante o processo de abate, pode haver contaminação da carne em diferentes pontos, principalmente quando realizadas em ambientes inadequados ou de maneiras impróprias, como o próprio estado de saúde dos animais pode comprometer a qualidade do alimento (SILVA *et al.*, 2016), considerando que, muitas vezes na linha de abate, ocorre a entrada de suínos que são portadores de micro-organismos, que geralmente, não causam sinais clínicos ou perdas evidentes de desempenho produtivo nos animais ou que não causam lesões evidentes durante o abate (CARDOSO, 2009), além de muitos deles representarem risco à saúde devido ao seu potencial em causar toxinfecções alimentares.

Diversas bactérias são frequentemente envolvidas em doenças transmitidas por alimentos e, por isso, são uma das maiores preocupações em relação à inocuidade dos produtos de origem animal (CARDOSO, 2009). Micro-organismos que são considerados patogênicos podem ser isolados de diversos locais, equipamentos e utensílios relacionados ao processo de abate, cuja contaminação tende a aumentar ao longo do dia e se disseminar a outros pontos (VAN CLEEF *et al.*, 2010) tanto por inúmeros gêneros de enterobactérias quanto *Staphylococcus* (SPESCHA *et al.*, 2006), entre outros. Análises microbiológicas realizadas em tonsila de suínos abatidos no Canadá mostraram a importância de membros do gênero uma vez que *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. pseudointermedius* foram isolados de tonsilas de carcaças de suínos aparentemente hígidos (O'SULLIVAN *et al.*, 2011). *Staphylococcus* spp. foram também isolados a partir de suabes nasais de suínos após a insensibilização bem como de carcaças avaliadas ao longo da linha (TENHAGEN *et al.*, 2009).

Na Holanda, *S. aureus* foi isolado a partir de funcionários de três grandes frigoríficos de suínos na área de inspeção *ante-mortem*, o micro-organismo foi detectado em funcionários responsáveis pela condução dos animais, médicos veterinários e seus auxiliares e em menor proporção dos funcionários que atuavam nas áreas consideradas limpas da linha, ou seja, após a evisceração, segundo o estudo os funcionários se contaminaram pela manipulação das carcaças (VAN CLEEF *et al.*, 2010).

No Brasil, também existe registro de *S. aureus* isolado em vários pontos da linha de abate em frigoríficos dos estados de MG e SP (BAKER *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2004). Um fator preocupante é o número de *S. aureus* resistentes a Meticilina isolados tanto em suínos como nas etapas de produção ao abate, este agente está disseminado e já foi identificado em outros países como Canadá (WEESE *et al.*, 2011). Conforme já comprovado na produção de carne, os próprios animais, trabalhadores, ambiente, equipamentos e utensílios utilizados podem ser fonte de contaminação, demonstrando a importância e o risco que a carne suína pode representar à saúde pública quando processada sem os cuidados mínimos necessários para garantir sua inocuidade.

Como consequência das operações de abate para obtenção de carne e derivados, originam-se vários subprodutos e/ou resíduos que devem sofrer processamentos específicos: couros, sangue, ossos, gorduras, aparas de carne, tripas, animais ou suas partes condenadas pela inspeção sanitária. Porém, para sua utilização no consumo humano, deve ser obtido mediante rigorosa inspeção higiênico-sanitária garantindo sua inocuidade para o consumidor (SILVA *et al.*, 2017). A qualidade microbiológica da carne suína consumida pela população é de muita importância para evitar a ingestão de patógenos emergentes nos suínos que podem representar um risco à saúde pública devido à ocorrência de toxinfecção ocasionada pelo consumo da carne contaminada. *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus*, dentre outras bactérias patogênicas presentes na superfície de carcaças suínas, entram na planta de abate a partir dos animais vivos e dos operários, não existindo procedimentos de inspeção especificamente direcionados para o controle desses micro-organismos (SHINOHARA *et al.*, 2008). A preocupação dos agentes de inspeção sanitária tem sido crescente com relação aos produtos cárneos processados e distribuídos ao consumo (FEITOSA *et al.*, 2017). No período de 2000 a 2015, *S. aureus* foi diagnosticado como

agente causal de 7,7% dos surtos intoxicação alimentar ocorridos no Brasil (BRASIL, 2015). Assim percebemos a importância do serviço de inspeção e a importância de se observar se o alimento que está adquirindo possui ou não serviço de inspeção.

Devido a relação do *S. aureus* com alimentos com alto teor de umidade e porcentagem de proteínas como, por exemplo, carnes e produtos derivados de bovinos, suínos e aves, ovos, leite e seus derivados e produtos de confeitaria são frequentemente relatados como fontes de contaminação em surtos (GERMANO; GERMANO, 2001). A carne suína é constituída em média por 75% de água, 22,8% de proteína, 1,2% de gordura e 1,0% de minerais, além de ser uma excelente fonte de vitaminas hidrossolúveis do grupo B, como tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridoxina (B6) e cobalamina (B12), bem como zinco, potássio, ferro e magnésio (ROÇA, 2008). Sendo assim, devido ao seu alto teor de umidade e nutrientes, a carne suína e seus derivados acabam tornando-se um importante veículo de transmissão de bactérias patogênicas, podendo causar DTA (PARDI et al., 2006). Além disso a carne suína ou seus derivados possuem o pH entre 4,5 e 7,0, baixa acidez e por isso são mais propícios para a multiplicação microbiana. Já em relação à atividade de água, as carnes frescas, curadas, aves, pescados, ovos e queijos, estão entre 0,86 e 1,00, dentro da faixa de multiplicação deste patógeno.

*S. aureus* é um micro-organismo de importância na cadeia de carne suína; trata-se de um micro-organismo comensal em suínos e humanos, e capaz de causar severas toxinfecções alimentares devido a produção de enterotoxinas e ainda, importante carreador de genes de resistência a antimicrobianos para outros micro-organismos. A intoxicação alimentar estafilocócica, causada pela ingestão de enterotoxinas produzidas principalmente pelo *S. aureus*, é uma das DTA mais comuns no mundo (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014), onde geralmente cursam com náusea, vômito, dores abdominais e diarreia, podendo agravar-se para septicemias e até morte, principalmente em pacientes imunodeprimidos (BRASIL, 2001). *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Yersinia enterocolitica* são importantes patógenos relacionados a casos de intoxicações e toxi-infecções alimentares, respectivamente (FORSYTHE, 2013; GERMANO e GERMANO, 2015).



Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2015), *S. aureus* foi o segundo maior agente patogênico causador de surtos de DTA no Brasil, ainda durante o período de 2000 a 2015, 2,1% dos surtos notificados estavam relacionados com o consumo de carne suína e seus derivados (BRASIL, 2015). No estado de Minas Gerais, foram registrados 72 surtos de intoxicação alimentar e dentre as pessoas envolvidas, 1016 manifestaram a doença e 3 óbitos foram registrados. Destes surtos, 27 foram confirmados pela contagem de SCP com mais de  $1 \times 10^5$  UFC/g de alimento e/ou pela detecção de enterotoxina(s) no alimento analisado, as quais envolveram, diversos alimentos entre eles pernil suíno (DIAS, 2012). Em Porto Alegre, no período de 2003 a 2011, *Staphylococcus aureus* foi responsável por 24 dos 173 surtos notificados, sendo o terceiro agente etiológico mais envolvido, correspondendo a 14% dos surtos (NASCIMENTO, 2013). Segundo Rivas, Viscaíno e Herrera, (2000), durante o abate há procedimentos, como o chamuscamento e a lavagem das carcaças, que podem reduzir a carga microbiana, no entanto, não há nenhuma operação capaz de eliminá-la completamente. Masson *et al.* (2012) relataram a ocorrência de SCP em 12% das amostras colhidas em um abatedouro de suínos no estado de São Paulo. Lima *et al.* (2004) avaliaram a contaminação superficial de carcaças suínas em um abatedouro frigorífico de Minas Gerais, das quais 11,7% (14/120) estavam contaminadas com *S. aureus*.

Internacionalmente, tem-se verificado a presença do *S. aureus* associados em surtos de intoxicação alimentar, como mostra Kérouanton e colaboradores em 2007 na França, onde 31 casos de surtos de intoxicação foram analisados em um período de 20 anos. Dentre esses casos, em 26 confirmou-se a presença da enterotoxina estafilocócica e 20 dos casos destes surtos continham alimentos de origem animal, envolvendo também carne suína. Em um estudo realizado na Holanda em 2009, Boer e colaboradores analisaram 2.217 amostras de produtos de origem animal, entre carnes bovinas, carnes de porco, vitela, cordeiro, carneiro, carnes de aves e caça, nas amostras analisadas, 11,9% confirmaram a presença de *Staphylococcus* resistentes a metilicina. A ocorrência do *S. aureus* em animais de produção e nos alimentos de origem animal pode representar um problema relevante na segurança e qualidade para o consumidor (FEßLER, 2011).

Esta transmissão do micro-organismo para o alimento pode ocorrer por várias vias, sendo as principais vias de contaminação os utensílios, os equipamentos e as mãos dos manipuladores de alimentos (LANGE *et al.*, 2008). Pesquisas mostram que os manipuladores de alimentos são responsáveis por 26% dos surtos de intoxicação alimentar (BRASIL, 2015). Em um estudo no município de Guarapuava-PR, realizado por Ré e colaboradores (2013), foram coletadas amostras de mãos e narinas de 20 manipuladores de alimentos de uma creche, destes, 40% eram portadores nasais e manuais do *S. aureus*, 35% portadores somente nasais e 20% portadores somente manuais.

Diante disto, é correto afirmar que alguns aspectos, referentes aos manipuladores, devem ser observados e controlados para que os manipuladores não constituam um fator de contaminação alimentar, como controle de saúde dos manipuladores, grau de instrução, hábitos pessoais de higiene corporal, utilização de procedimentos operacionais padronizados, utilização de boas práticas de fabricação e hábitos pessoais dos manipuladores (COSTA *et al.*, 2013; FLORES, 2015). Dessa maneira, para garantir a produção de alimentos seguros, é fundamental a implantação de sistemas que melhorem a obtenção de matérias primas livres de patógenos sendo também uma exigência dos órgãos oficiais de saúde (WHO, 2018).

Outro aspecto que deve ser observado e que tem grande importância atualmente é o bem-estar animal, conceito desenvolvido pelo Comitê Brambell e aprimorado pelo *Farm Animal Welfare Council* do Reino Unido (LUDTKE, DALLA COSTA, 2012), que se baseia no respeito as cinco liberdades que são: fisiológica (livre de sede, fome e má-nutrição); ambiental (edificações adaptadas); sanitária (livre de fratura e doença); comportamental (livre para expressar seu comportamento normal); e psicológica (livre de medo, estresse e ansiedade) (SANTOS, 2004). O manejo correto tem impacto relevante sobre o estresse e, conseqüentemente, sobre a qualidade da carne (LUDTKE *et al.*, 2010). Ou seja, as práticas de bem-estar animal (BEA) objetivam a minimização dos efeitos negativos perante a contaminação e qualidade da carne suína, sendo que essa prática deve ser estabelecida do nascimento até o abate do animal, proporcionando aos animais uma melhor qualidade de vida (FRASER, 2013).

Dentro dessa preocupação se enquadram o sistema de criação, manejo pré-abate, embarque e transporte desses animais das granjas aos frigoríficos,

que exercem grande influência no bem-estar e consequentemente na qualidade da carne (MACHADO *et al.*, 2014). O transporte é um fator muito estressante para os animais, já que os expõe a novos fatores potencialmente estressantes, tais como dificuldade no embarque e desembarque, barulho, vibrações, mudanças de velocidade brusca de direção e estabilidade do caminhão e variação da temperatura ambiental. O abate de suínos é usualmente precedido pelo transporte, o qual normalmente está associado a um esforço físico, que pode prejudicar o bem-estar animal. Como consequência, ocorrem danos ou contaminações na carcaça além de alterações nas condições do tecido muscular (LUDTKE *et al.*, 2009).

### 2.3 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* compreende 53 espécies e 28 subespécies (EUZÉBY, 2016). Estas bactérias pertencem a família Staphylococcaceae, são cocos com diâmetro de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; LIMA *et al.*, 2015), classificadas como Gram positivo, podem se apresentar isolados ou aos pares, em cadeias curtas ou aglomerados irregulares semelhante a um cacho de uva, imóveis, anaeróbicos facultativos, catalase positiva e fermentam glicose com produção de ácido (SANTOS *et al.*, 2007). Apresentam colônias com coloração variando de branca a amarelo alaranjado pela presença de pigmentos carotenoides (GOMES, 2013).

Foram reconhecidos como gênero bacteriano em 1980, a partir disto, foi *S. aureus* um dos de maior importância. Este gênero é composto por diversas espécies, muitas frequentemente encontradas no ambiente externo e na microbiota da pele e mucosas nasais de seres humanos e animais, considerados simbioses, além de serem encontrados nos mais diversos ambientes desde a água até o pó, possuindo natureza ubiquitária e podendo ser encontrado no trato gastrointestinal (BAKER *et al.*, 2008). É uma bactéria do grupo dos cocos gram-positivos que faz parte da microbiota humana, mas que pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outras (ALMEIDA *et al.* 2016).

Rotineiramente o teste da catalase é utilizado para diferenciar os *Staphylococcus* (catalase positiva) dos *Streptococcus* (catalase negativa). Esses dois grupos constituem os principais micro-organismos Gram positivos de importância clínica, as infecções por *Staphylococcus* spp. podem ser simples até fatais, e de difícil tratamento quando tratamos de infecções hospitalares, devido a capacidade estes agentes manifestar resistência aos antibióticos (SANTOS *et al.*, 2007). A habilidade em produzir coagulase divide este gênero em dois grupos *Staphylococcus* coagulase negativo e *Staphylococcus* coagulase positivo, que podem causar doenças em animais e humanos (GOMES, 2013). Outras características destas bactérias são termonuclease positivas. O gênero inclui patógenos de humanos e animais, tanto coagulase positiva (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*), quanto os coagulase negativa como *S. saprophyticus*, *S. epidermitis* e *S. haemolyticus*, entre outros (BLAIOTTA *et al.*, 2010). A maioria das espécies de *Staphylococcus* são coagulase negativa (CUNHA, *et al.*, 2002).

A faixa temperatura de crescimento para *Staphylococcus* spp. é de 7°C a 47°C, no entanto, as enterotoxinas estafilocócicas são produzidas entre 10°C e 46°C, com uma temperatura ótima entre 40°C e 45°C, sendo que os extremos de temperatura estão na dependência dos demais parâmetros que deve encontrar-se em condições ótimas. Ainda quanto as características metabólicas, as bactérias deste gênero, crescem sob pressão osmótica alta, são resistentes ao dessecação e tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl e a nitratos. Em relação ao pH crescem na faixa de 4 a 9,8 (SANTOS, *et al.*, 2007). Quanto à atividade de água, o valor mínimo necessário para o micro-organismo se desenvolver é 0,86, embora sob condições ideais, esta bactéria já tenha se desenvolvido em atividade de água de 0,83 (FRANCO; LANDGRAF, 2002). As células bacterianas dos *Staphylococcus* spp. são destruídas por tratamento térmico, mas suas enterotoxinas permanecem ativas nos alimentos, por isso consideradas termoestáveis, sendo um risco em potencial para a saúde pública (PRADO, 2015).

*S. aureus* é um dos agentes mais comuns associados a surtos de intoxicação alimentar, pela produção de enterotoxinas, normalmente transmitidos aos alimentos através de manipuladores, portadores assintomáticos, já que pertence à microbiota transitória e residente dos

humanos, e de animais como o gado leiteiro portador de mastite (STAMFORD *et al.*, 2006). Agente não formador esporos e é umas das bactérias mais resistentes (GERMANO; GERMANO, 2001).

*S. aureus* foi considerado por anos como a única espécie do gênero que produzia enterotoxina, assim como a coagulase. Entretanto, outras espécies foram identificadas em surtos de intoxicação alimentar, o que levou a mudança na legislação brasileira (BRASIL, 2001), que cobra a pesquisa de enumeração de estafilococos coagulase positiva (SCP) e não mais a enumeração de *S. aureus* (HENNEKINNE *et al.*, 2012), uma enzima que estimula a conversão do fibrinogênio em fibrina, que resulta na formação de coágulos de fibrina no plasma de mamíferos (ATIQUE *et al.*, 2012), relacionando ao fator de virulência – produção de coagulase – com o risco de síntese de enterotoxinas estafilocócicas.

Todavia, só uma espécie patogênica para os humanos é capaz de produzi-la, *S. aureus*. Desta forma, esta enzima torna-se importante na identificação desta espécie (ATIQUE *et al.*, 2012). Contudo, estudos têm demonstrado que algumas linhagens de espécies coagulase negativas são potencialmente produtoras de enterotoxinas *in vitro* e há registros de surtos de intoxicação alimentar, inclusive no Brasil, associados a espécies não produtoras da enzima (ANDRADE *et al.*, 2011). Algumas espécies de *Staphylococcus* causam uma variedade de doenças através da produção de enzimas e toxinas, da invasão de células e tecidos do hospedeiro, e da habilidade de escapar do sistema imunológico (TAPONEN *et al.*, 2012).

Estes patógenos são oportunistas e a maioria das estirpes também produzem hemolisinas, que são enzimas que lisam as hemácias, são desoxirribonuclease (DNase) e nuclease termoestável positivos, novobiocina sensíveis além de fermentarem manitol. As infecções estafilocócicas podem ser endógenas, causadas por bactérias do próprio indivíduo, ou exógenas, adquiridas de outros doentes ou portadores saudáveis. Sua transmissão pode ser por contato direto ou indireto e a gravidade da infecção irá depender da imunocompetência do indivíduo (NASCIMENTO; RAMOS, 2016), pode ocasionar impetigo, foliculite, furunculose, carbunculose, quando na pele. *S. aureus* pode produzir até 22 enterotoxinas (EE), sendo considerado, por esse

motivo, um potencial agente biológico capaz de causar enfermidades alimentares em humanos (ALVAREZ; MIMICA, 2012).

Essa bactéria foi uma das primeiras a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, mas, devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS *et al.*, 2007). Culminando com outra implicação na área da saúde pública, no que diz respeito a cepas de *S. aureus* resistente a antimicrobianos e a capacidade de transferência dos genes de resistência a seres humanos, a exemplo da meticilina, MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), a qual tem sido fonte crescente de infecções hospitalares em todo o mundo e foi isolado em animais de produção (DE BOER *et al.*, 2009). MRSA, compreende um grupo de *S. aureus* resistentes a todos os antimicrobianos betalactâmicos (BARBER, 1961). Inicialmente, infecções atribuídas ao MRSA eram exclusivamente demonstradas em hospitais, entretanto, nos últimos anos, as infecções causadas por MRSA também foram descritas na comunidade e têm sido documentadas de forma crescente em todo o mundo (GELATTI *et al.*, 2009). O grande número de infecções associadas, a capacidade crescente em adquirir resistência aos antimicrobianos e a habilidade de se manter viável por grande período de tempo, tornou esta estirpe bacteriana uma das mais estudadas.

Estudos de epidemiologia molecular mostram que cepas multirresistentes do *S. aureus* se disseminaram entre diferentes locais como hospitais, países e continentes além de serem responsáveis por infecções hospitalares em todo o mundo (AKLILU; ZUNIT; HASSAN; CHEN, 2013), também relacionados a intoxicações alimentares. Algumas linhagens exibem afinidade seletiva por algumas espécies de animais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Alguns estudos recentes relatam o isolamento de linhagens destes micro-organismos em alimentos de origem animal, incluindo carne suína, gado bovino, frango, além de queijo bovino, leite e seus derivados (SCABIN, 2013).

O comportamento de transferência dos *Staphylococcus* coagulase positiva do animal para o homem e vice-versa é um campo sendo descoberto através de pesquisas, um estudo na Malásia mostrou que de 103 estudantes de veterinária, 23,3% eram portadores de *S. aureus* resistentes a meticilina

(AKLILU; ZUNIT; HASSAN; CHEN, 2013). As vias de transmissão podem se dar de pessoa para pessoa, de objetos para pessoa (ou vice-versa), de animais para pessoas (ou vice-versa) e de muitas outras maneiras, uma vez que essas bactérias são de ampla distribuição. Pode ocorrer inclusive de pessoas infectadas, mas que não apresentam sintomas, para outras saudáveis. Um exemplo dessa via de transmissão são as infecções neonatais, que ocupam o segundo lugar na etiologia de todas as infecções, sendo superadas apenas pela *E. coli*. Isso se dá porque a porcentagem dessas bactérias encontradas nos enfermeiros é grande, sendo assim, mesmo os berçários sendo submetidos a rigorosos processos de limpeza, ainda há um risco de transmissão (AKLILU; ZUNIT; HASSAN; CHEN, 2013).

### 2.3.1 *Staphylococcus aureus* e antimicrobianos na suinocultura

Por se tratar de um micro-organismo ubíquo está presente em todas as granjas e em todas as idades dos suínos, e as principais espécies isoladas são *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. epidermitis* e *S. saprophyticus* (TAYLOR, 1999). Na literatura, há descrito uma grande variedade de problemas e manifestações clínicas em suínos acometidos por *Staphylococcus*, como doenças do aparelho locomotor, gastrointestinal, cardiorrespiratório, problemas dermatológicos, abscessos, reprodutivos entre outros (MENIN *et al.*, 2008). Além de ser também responsável por diversos problemas clínicos como infecções no trato urinário, pleurite, doenças da pele, abscessos diversos, doenças reprodutivas, otites entre outras (SOBESTIANSKY *et al.*, 2012; DROLET & DEE, 1999; MENIN *et al.*, 2008).

Outros problemas relatados na literatura são referentes a morte súbita observada principalmente após o reagrupamento ou transporte, frequentemente associada a endocardite valvular de origem bacteriana incluindo o *Staphylococcus* spp., cujo gênero irá variar conforme região, idade, sanidade do animal e problemas reprodutivos (TAYLOR, 1999).

A produção de suínos varia desde sistemas intensivos onde há uma densidade elevada de animais até as criações de subsistência, onde há poucos animais, mas em ambos os casos em especial a suinocultura industrial, ocorre um incremento em tecnologias que aumentem os índices produtivos. Nesta



busca tecnológica houve mudanças marcantes na criação de suínos, principalmente em relação aos resultados referentes a fatores como melhoramento animal, nutrição e sanidade (BARCELLOS *et al.*, 2008).

Porém, com a intensificação dos métodos de produção ocorreu um aumento significativo no quesito pressão de infecção pelo adensamento dos animais e no nível de estresse para estes animais, resultando no desencadeamento de problemas sanitários diversos (BARCELLOS *et al.*, 2008). Desta forma, o uso de antimicrobianos tornou-se rotina nas granjas, passando de tratamento empírico direcionado para uso como parte do manejo de forma profilática (prevenção de doenças) e como promotor de crescimento, que se refere à utilização de antibióticos na criação de animais a fim de que eles aumentem a conversão alimentar e cresçam mais rápido, para que possam ser abatidos em menor tempo e aumentar os lucros do produtor.

O uso terapêutico é aquele que se direciona ao controle de infecções bacterianas pré-existentes, de forma individual ou grupal, mas a terapia individual em suinocultura muitas vezes é inviável. Estrategicamente abrimos mão do tratamento terapêutico logo quando do aparecimento de sinais e ou sintomas de doença em pelo menos um animal do grupo, esperando-se que os demais venham a manifestar a doença (PALERMO-NETO, 2011). Para tratamento de um grupo de suínos é comum utilizar-se a administração oral, pela via oral ou digestiva, seja por meio da inserção na alimentação ou via água de bebida, formas de tratamento que trazem alguns riscos, como, por exemplo, a possibilidade da mistura não ser suficientemente homogênea. Também pode ocorrer a incompatibilidade do antimicrobiano com componentes da ração, a insolubilidade e instabilidade na água e também a redução do consumo em consequência de inapetência ou alteração na palatabilidade (PALERMO-NETO, 2007). Este uso exacerbado de antimicrobianos na medicina veterinária culminou com o aumento da resistência (WHO, 2018) uma vez que, pode ocorrer através da prescrição não terapêutica a seleção de bactérias comensais e patogênicas à resistência aos antibióticos (CHAPIN *et al.*, 2005).

Ainda em relação ao risco destas vias de fornecimento, o intestino é o maior local de transferência de resistência antibiótica, tanto por causa do vasto número de bactérias presentes quanto em razão das oportunidades de disseminação destas em animais criados intensivamente (VAZ, 2009).

O uso prudente de antimicrobianos implica em balancear a susceptibilidade do agente e a concentração do antimicrobiano nos tecidos afetados com os eventuais efeitos adversos que ele possa produzir (PALERMONETO, 2007) tornando-se fundamental o conhecimento do perfil farmacocinético do antimicrobiano, ou seja, a indicação para o uso de antimicrobianos específicos será tanto mais precisa quanto maior for o conhecimento sobre o agente etiológico da doença que se pretende tratar ou prevenir (BARCELLOS *et al.*, 2012).

A escolha dos medicamentos não é tarefa fácil, pois existe no mercado de produtos veterinários a opção de uma série ampla de princípios ativos e diversas marcas no mercado (BARCELLOS *et al.*, 2008).

Este uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos vem ocasionando que este agente manifeste genes de resistência a antibióticos, em especial a ocorrências de cepas MRSA (CERQUEIRA e ALMEIDA, 2013). Atualmente, a maior preocupação envolve estirpes resistentes à penicilina, à meticilina e a outros  $\beta$ -lactâmicos.

Como consequência da colonização e/ou infecção por estas bactérias, em animais de produção, destaca-se a dificuldade na terapêutica das infecções, desde que comumente além dos beta-lactâmicos, a grande maioria das estirpes MRSA possui outros determinantes de resistência tais como: aos aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, fluoroquinolônicos entre outros (RINCÓN *et al.*, 2014; BECKER *et al.*, 2014).

Alguns trabalhos descrevem a presença de MRSA em cães, gatos, cavalos (BUSSCHER *et al.*, 2006), vacas com mastite (JUHÁSZ-KASZANYITZKY *et al.*, 2007), suínos (SERGIO *et al.*, 2007) e animais silvestres (WALTHER *et al.*, 2008). MRSA foi isolado de pacientes que tiveram contato com suínos (VOSS *et al.*, 2005) e de pessoas que moravam próximas a granjas (HUIJSDENS *et al.*, 2006), demonstrando semelhanças genotípicas. BAGCIGIL *et al.* (2007) relataram que, *S. aureus* presente na mucosa nasal pode ser transmitido entre animais e humanos. Dentre as espécies de animais domésticos, os suínos têm sido apontados como importantes reservatórios de cepas MRSA, despertando pesquisas que buscam melhor compreender a epidemiologia da transmissão e evolução da resistência antibiótica destes micro-

organismos entre humanos e animais (VERKADE e KLUYTMANS, 2014; NORMANNO et al., 2015; BUTAYE et al., 2016).

### 2.3.2 Resistência e multirresistência a antimicrobianos

Quando foram introduzidos os antimicrobianos na terapia, acreditava-se que estaria resolvido um dos maiores problemas da medicina moderna, o controle das doenças. De fato, os agentes antimicrobianos representaram, na última metade do século XIX, a possibilidade de debelar diversos tipos de doenças infecciosas (GARCIA, 2011). Não se contava, entretanto, que esses agentes patogênicos pudessem desenvolver mecanismos para criar cepas resistentes ou multirresistentes às diversas classes de antimicrobianos. O conceito de multirresistência é variável e comumente, um micro-organismo é caracterizado como multirresistente quando apresenta resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos (GARCIA, 2011). Desde o início da utilização de antibióticos, paralelamente à evolução dos antibióticos, observou-se uma evolução de taxa de resistência crescente de micro-organismos originalmente suscetíveis e de outros micro-organismos intrinsecamente resistentes.

Os mecanismos de resistência são classificados em intrínseco, adquirido ou genético. A resistência é intrínseca quando o antimicrobiano não localiza seu sítio de ação na parede da célula e membrana da bactéria ou não consegue penetrar as estruturas celulares, portanto, não alcança seu sítio de ação; a resistência adquirida ocorre pela exposição do agente patógeno a antimicrobianos sem que ocorra modificação em seu código genético, o que significa que, ao se ausentar da presença do antimicrobiano, o micro-organismo recupera sua suscetibilidade; na resistência genética, o agente patógeno perfaz uma mutação cromossômica ou adquire material genético por meio de plasmídeos, transposons ou outro material que esteja fora do cromossomo, alterando a informação genética – essa alteração genética ocorre por meio de fenômenos como transformação, transdução ou conjugação (COSTA e SILVA JUNIOR, 2017).

A resistência antimicrobiana do *S. aureus* data do início da década de 1960, onde surgiram as cepas MRSA, que foram identificados em hospitais

britânicos pela primeira vez. Essas cepas espalharam-se rapidamente, atingindo proporções epidêmicas no Norte da Europa em meados da década de 1970, mais tarde invadindo a Europa Meridional, EUA, Austrália e o Extremo Oriente (LAMARO *et al.*, 2009) e no início dos anos 1990 alcançam a América Latina (RODRÍGUEZ-NORIEGA *et al.* 2010). Com a adoção de rígidas políticas de controle de infecção hospitalar, a frequência de cepas hospitalares MRSA (HA-MRSA) diminuiu em alguns países, mas começaram a disseminar-se na comunidade (CA-MRSA) (LAMARO *et al.*, 2009).

Pelo surgimento da resistência à penicilina, foi preciso que outro antibiótico fosse capaz de tratar as infecções estafilocócicas. Assim, foi criado o beta-lactâmico sintético meticilina, que era resistente à ação das beta-lactamases (GELATTI, 2009). Este antibiótico foi eficaz até os anos 70, quando novamente, cepas resistentes surgiram. São os chamados *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina denominado de ORSA (*oxacillin resistant S. aureus*) ou MRSA (*methicillin resistant S. aureus*) (GELATTI, 2009).

A resistência, desenvolvida por *S. aureus* à penicilina, por exemplo, impôs limites no tratamento de infecções estafilocócicas severas em pacientes hospitalizados (DÓRIA, 2007). Segundo Sader (2015), estudos demonstram que, hoje, quase a totalidade de amostras de cepas dessa bactéria revela resistência à penicilina, pela produção de betalactamases, que degradam a droga e outros betalactâmicos (ampicilina, amoxicilina) em um percentual que chega a 90%.

O mecanismo da resistência de *S. aureus* aos antimicrobianos pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídeos. Sendo assim, a resistência está relacionada à produção de uma enzima predominantemente extracelular denominada penicilinase, sintetizada pelos estafilococos após exposição aos beta-lactâmicos, que hidrolisa o anel beta-lactâmico e inativa o antibiótico (GUIMARÃES, 2010; PALERMO-NETO, 2011). As bactérias podem adquirir resistência as antibióticos de uma forma intrínseca ou através da aquisição de elementos genéticos carreando genes de resistência. A persistência dessa resistência no animal depende de um grande número de fatores externos, como o estresse, transporte, manejo, doses terapêuticas utilizadas e exposição previa a antibióticos (VAZ, 2009).

Com o surgimento das isoxazolilpenicilinas (oxacilina, dicloxacilina, cloxacilina e flucloxacilina) que são estáveis em pH ácido e apresentam alto índice de ligação às proteínas plasmáticas (80%), a meticilina deixou de ser utilizada em muitos países, inclusive no Brasil. A expressão “meticilina-resistente” continua sendo utilizada, para designar as cepas de *Staphylococcus* que não respondem ao tratamento com oxacilina e, por extensão, com as demais isoxazolilpenicilinas (AMATO NETO *et al.* 2000). A resistência à oxacilina determinou o aumento indiscriminado de glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina), para terapia empírica e profilaxia de infecções hospitalares estafilocócicas, o que teve como consequência o surgimento de cepas resistentes à vancomicina. A primeira cepa com sensibilidade reduzida à vancomicina (VISA) foi isolada em 1997 no Japão, (HIRAMATSU *et al.*, 1997) e com resistência plena à vancomicina (VRSA) foi isolada em 2002 nos EUA (MARTINS; CUNHA, 2007).

MRSA foi isolado pela primeira vez em animais criados para alimentação humana em 1972, a partir de casos de mastite em vacas na Bélgica. A partir de então este micro-organismo surgiu em diversas espécies como gatos, cachorros, cavalos, ovelhas, suínos, bezerros e aves (CERQUEIRA, 2013). Porém há uma distinção entre as estirpes isoladas de animais de companhia das isoladas em animais destinados a produção de alimentos. Animais de companhia são contaminados pelo contato com pessoas infectadas ou colonizadas com MRSA, ou seja sua presença nestes animais se deve ao contato com o ser humano, já em animais de produção, um clone de origem desconhecida surgiu recentemente, sugerindo que o MRSA nestes animais decorre do uso de antibióticos na pecuária (CERQUEIRA, 2013). A carne suína é a mais estudada devido ao envolvimento epidemiológico desta espécie com a transmissão deste micro-organismo específico que ocorre de animais de produção para humanos. Já foram isoladas de infecções estirpes de MRSA associadas a comunidade (CA-MRSA), sem conexão com ambiente hospitalar, associado a suínos e com estudos subsequentes que confirmam que o contato com esta espécie é um fator de risco para transmissão do MRSA ao homem (ALVARES; LABARCA; SALLES, 2010) e outros estudos já identificaram esta cepa em animais de companhia como cães e gatos, além de cavalos (CADDICK, 2006), na produção vacas com

mastite e suínos (SERGIO *et al.*, 2007), além de animais silvestres (WALTHER *et al.*, 2008).

Estes isolados de *S. aureus* resistentes a múltiplos fármacos são de preocupação pública, já que estes micro-organismos podem ser transferidos ao homem via cadeia alimentar, que é um limitante ao seu controle. Cepas multirresistentes tem sido relatadas em carnes, laticínios, pescado, aves, ovos e saladas. Bacteremias, causadas por este agente, estão frequentemente associadas a um prognóstico ruim, incluindo mortalidade em até 30 dias na faixa de 20 – 40% (DUARTE *et al.*, 2018).

Já na produção de animais a utilização de antimicrobianos e quimioterápicos gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos, porém seu uso excessivo e nem sempre criterioso ou racional trouxe algumas dificuldades, sendo a maior delas representada pela progressiva resistência bacteriana aos fármacos (LUCIO *et al.*, 2013).

Na suinocultura, o ponto crítico do uso dessas substâncias e a utilização como aditivos promotores de crescimento que pode ocorrer devido a ingestão de subdoses seja por deficiência no preparo da ração ou na quantidade ingerida pelos suínos. O uso incorreto no tratamento dos animais e humanos, associado a seleção natural dos micro-organismos, provavelmente resultou o fenômeno de resistência, tanto na medicina humana quanto na veterinária (COELHO *et al.*, 2007). Assim sendo, o potencial de mutação e alterações genéticas entre bactérias, combinado com o curto tempo de geração bacteriano, e de grande limitação no uso de fármacos para o controle de infecções nos animais (VAZ, 2009) e comprova claramente a importância epidemiológica e os riscos do uso inadequado de antibióticos na produção animal, em especial a suinocultura.

*S. aureus* possui três mecanismos distintos de resistência à meticilina: a) hiperprodução de beta-lactamases; b) presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP - *protein binding penicilin*) alterada denominada PBP 2a; c) modificações na capacidade de ligação das PBPs (TOMASZ *et al.*, 1989). De Lencastre e colaboradores (1991) sugerem que os três mecanismos podem estar presentes numa mesma amostra, inclusive interagindo entre si. A oxacilina é a droga representante deste grupo por ser a mais resistente à degradação e a mais sensível para detecção de heterorresistência. Entretanto, se *S. aureus* for

resistente à ela, é resistente à também à Meticilina e à todos os beta-lactâmicos (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

O principal mecanismo que confere tal resistência está relacionado à alteração do sítio de ação dos beta-lactâmicos, ou seja, alteração das proteínas ligadoras de penicilinas denominadas PBPs. As PBPs são enzimas importantes na síntese da parede bacteriana. A presença de enzima alterada, denominada PBP2a ou PBP2', leva a baixa afinidade da oxacilina pelo local de ligação na parede celular da bactéria com consequente inatividade (MURRAY, 2015).

Estes mecanismos responsáveis pela resistência de *Staphylococcus* spp. aos agentes antimicrobianos que possuem anel beta-lactâmico. Um mecanismo é a produção de beta-lactamases, através do gene *blaZ*, que são enzimas responsáveis pela degradação do antimicrobiano através de uma reação de hidrólise; e o outro mecanismo, onde o gene *mecA* que está localizado no cromossomo, está envolvido, é uma alteração nas proteínas fixadoras de penicilinas (PBPs) presente em cepas resistentes a Meticilina (MRSA) (Ferreira *et al.*, 2010). As PBPs são enzimas que catalisam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. Além das PBPs 1, 2 e 3 serem essenciais e terem alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos beta-lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005). A resistência à meticilina em estafilococos é devida à produção de uma PBP adicional, anômala, denominada PBP2a, que apresenta baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos (GELLATI *et al.*, 2009).

Estas alterações são codificadas pelo gene *mecA*, que faz parte de um elemento genético móvel encontrado em todos os isolados com este tipo de resistência, denominado cassete estafilocócico do cromossomo *mec* (SCCmec). Este elemento genômico é composto pelo complexo do gene *mec*, que codifica resistência à oxacilina, e pelo complexo do gene *ccr*, que codifica recombinases responsáveis pela sua mobilidade e podem conter outros genes de resistência para outros agentes antimicrobianos.

Já em 2002 foi descrita a transferência da resistência à este antibiótico de bactérias como estreptococos resistentes à vancomicina (VRE) para estafilococos. No Brasil, o primeiro caso de VRSA (*S. aureus* resistente à vancomicina) foi descrito em abril de 2014. Os VRSA apresentam resistência



completa aos glicopeptídeos, e o seu mecanismo de resistência está relacionado à aquisição por conjugação, pelo *S. aureus*, de um plasmídeo ou transposon carreador do gene *vanA* proveniente do *Enterococcus faecalis*, resistente aos glicopeptídeos.

Além do VRSA, há outro fenótipo, o VISA (*Vancomycin-intermediate S. aureus*), que está relacionado com o espessamento da parede bacteriana, impossibilitando a ação do glicopeptídeo devido à captura de suas moléculas que ficam retidas na parede bacteriana e comprometem a eficácia terapêutica deste agente. Semelhante à oxacilina, apresenta estágio inicial de resistência, denominado heterorresistência, com presença de subpopulações resistentes para este antimicrobiano.

Obviamente que essa resistência assusta, mas ainda assim o VRSA e VISA são eventos raros. Não obstante, é preciso que a ciência prossiga cada vez mais rápido, antes que seja tarde. Sobre as pesquisas, sobre a Teixobactina, onde temos, uma nova molécula descoberta que poderá originar nova classe de antibióticos e tratar as infecções por *S. aureus* multirresistentes (MURRAY, 2015).

A resistência aos aminoglicosídeos pode resultar de modificações do alvo na bactéria, alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática ou por inativação enzimática (TAVARES; PINTO, 2004). A alteração do local de ação resulta de uma mutação pontual com consequente perda ou alteração de uma proteína específica na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, que atua como sítio de ligação do fármaco em micro-organismos susceptíveis, sendo a causa comum de resistência à Estreptomicina (LECLERCQ, 1999).

A inativação enzimática é um tipo de resistência adquirida por plasmídeos ou transposons, a qual é promovida pela ação das enzimas N-acetiltransferases (AAC), O-nucleotidil-transferases (ANT) e O-fosfotransferases (APH). A enzima AAC vai modificar o grupo amino, enquanto a ANT e APH atuam no grupo hidroxilo, quebrando as ligações e inativando o antibiótico (KOTRA et al, 2000). *S. aureus* é uma das bactérias que usa este mecanismo para inativar esta classe farmacológica (KOTRA et al., 2000).

Os mecanismos de resistência bacteriano às tetraciclina incluem a inativação enzimática da molécula do antibiótico, alteração da permeabilidade da membrana, bombas de efluxo e alterações do alvo (GARCIA, 2011). A



alteração do local de ação ocorre por ligação de proteínas ao ribossoma, tornando-o inacessível à tetraciclina. O modo exato de interação da proteína “protetora” com o ribossoma ainda não é totalmente entendido (FISCHER; MOBASHERY, 2010). O gene *tet* que codifica para esta resistência foi encontrado em dois transposões bacterióides, este é um gene de resistência que codifica enzimas estruturalmente semelhantes as oxidoredutases, que modificam a estrutura da tetraciclina na presença de oxigênio e NADPH, inativando-a (FISCHER; MOBASHERY, 2010).

As Bombas de efluxo são um mecanismos de resistência que resulta da aquisição de genes mediada por plasmídeos ou transposons. O gene *tet* codifica para uma grande superfamília de proteínas de efluxo, as MFS, protegendo o ribossoma da ação do fármaco. A resistência às tetraciclina codificada por plasmídeos em *E. coli* resulta deste mecanismo de efluxo (CRUZ, 2008).

Em relação aos genes de resistência, temos gene *femA* que é específico de *S. aureus*, e utilizado para identificação dos isolados obtidos. Já os genes *femA* e *femB* também codificam proteínas que influenciam o nível de resistência conferido a Meticilina.

O gene *vanA* é um gene plasmidial, que originalmente foi transferido de um *Enterococcus faecalis* para cepas MRSA, e assim confere resistência à vancomicina por um mecanismo ainda desconhecido (MIMICA et al., 2006). O primeiro caso de VRSA-*Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina foi reportado nos EUA, Michigan, em um paciente de 40 anos, com diabetes e insuficiência renal crônica, e portador de VRE (*Enterococo resistente à vancomicina*). Quando há presença do gene *vanA*, nesse VRSA (*Staphylococcus aureus resistente à vancomicina*), sugere que a resistência pode ter sido adquirida com a troca do material genético do VRE - Enterococo resistente à vancomicina, isolado da mesma amostra (ANVISA, 2017).

Temos o gene plasmidial *tet(k)* que confere resistência às tetraciclina, antibióticos de amplo espectro de ação, cuja a existência de cepas resistentes já foi relatada (ULLAH et al., 2012).

O cassete cromossômico estafilocócico *mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) é um elemento genético móvel, considerado uma ilha genômica de resistência presente em estafilococos (MIYOSHI, 2017). Esse elemento está localizado em um sítio específico do cromossomo (attBSCC),

próximo a origem de replicação. O attBSCC está localizado a montante de uma ORF de função desconhecida, denominada *orfX*, a qual é bem conservada nos *Staphylococcus*. Esta localização confere uma importância estratégica para transcrição imediata deste elemento e de genes de resistência aos antimicrobianos (MIYOSHI, 2017). A organização estrutural e o conteúdo genético dos elementos SCCmec são variados, tendo sido caracterizados onze tipos de SCCmec, (ZONG *et al.*, 2011). Os SCCmec tipos I, IV, V, VI e VII (os menores cassetes) não carregam nenhum gene de resistência além do *mecA* (com exceção das variantes IA, IVA e IVC), enquanto que os tipos II e III abrigam genes de resistência a múltiplos antibióticos e a metais pesados, devido a incorporação de plasmídios (pUB110, pl258 e pT181) e transposons (Tn554 e  $\psi$ Tn554) que carregam genes de resistência a eritromicina (*ermA*), estreptomicina (*spc*), kanamicina, tobramicina (*aadD*), bleomicina (*ble*), tetraciclina (*tetK*), cádmio (*cad*) e mercúrio (*mer*) (ZONG *et al.*, 2011). Além disso, os cassetes possuem uma relação epidemiológica, estando os SCCmec tipos I, II e III relacionados com isolados de origem hospitalar e os tipos IV, V, VI e VII com isolados de origem comunitária (ZONG *et al.*, 2011).

O SCCmec pode ser dividido em tipos e subtipos. O tipo do SCCmec é definido baseado na organização de dois sítios genéticos: o complexo *mec* e o complexo *ccr*. O complexo *mec* é responsável pela expressão da proteína PBP2a. Até o presente, foram descritos cinco classes de complexos *mec*. O complexo *mec* classe A é o protótipo de complexo *mec*, formado pelo gene *mecA*, os reguladores (*mecR1* e *mecI*), uma região hipervariável (HVR) e a IS431. Nos demais complexos *mec* (B-E), o gene *mecI* e/ou o gene *mecR1* estão parcialmente ou completamente deletados, substituídos por sequências de inserção (IS) como as IS1272 e IS431 (ITO *et al.*, 2001).

O complexo *ccr* codifica recombinases da família invertase/resolvase responsáveis pela integração e excisão precisa do SCCmec inteiro (ITO *et al.* 2001). São conhecidos cinco tipos de complexo *ccr* (*ccrAB1*, *ccrAB2*, *ccrAB3*, *ccrAB4* e *ccrC*). Além desses dois complexos, o SCCmec possui regiões denominadas de regiões J ou “Junkyard”. Todos os SCCmec possuem três regiões J, que foram primeiramente designadas como L-C, C-M e I-R, sendo depois referidas como região J1 (L-C), localizada entre a junção à direita do cassete e os genes *ccr*; região J2 (C-M) entre os genes *ccr* e o complexo *mec* e

a região J3 (I-R) entre o complexo *mec* e a *orfX* situada na porção 3' terminal do cassete. Essas regiões podem albergar genes de resistência a outras classes de antibióticos, além de outros elementos não essenciais ao cassete (MIYOSHI, 2017).

### **3 OBJETIVO GERAL**

O presente estudo teve como objetivo geral identificar o perfil genotípico e fenotípico da resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* em cadeia produtiva de carne suína.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Detectar e quantificar *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras obtidas na cadeia produtiva da carne suína;
- Avaliar a resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* em relação a diferentes tipos de antimicrobianos
- Caracterizar os perfis genéticos de *Staphylococcus aureus* considerando genes associados a resistência a antimicrobianos
- Comparação do perfil fenotípico e genotípico entre resultados caracterização de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 LOCAL DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS**

Para o desenvolvimento do estudo foram selecionadas dez granjas de terminação de suínos e um abatedouro frigorífico de suínos fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal, localizado no estado do Paraná (Brasil), onde foram realizadas as coletas entre setembro de 2016 e fevereiro de 2017.

Nas dez granjas de terminação foram coletadas amostras do piso da baias com o uso de pro-pé esterilizado umedecido em solução salina, realizando andar em forma de “X” dos extremos oblíquos na baia onde se encontrava o lote em estudo. No abatedouro frigorífico, foram amostradas aleatoriamente dez carcaças pertencentes ao mesmo lote de suínos (correspondente ao lote da coleta da granja de terminação) em quatro pontos distintos ao longo do abate: (a) após sangria, (b) após chamuscamento, (c) após evisceração e (d) após lavagem final. Na Tabela 1 podem ser obtidas as informações sobre a metodologia de coleta das amostras obtidas no estudo. Para assegurar que a mesma carcaça fosse coletada nos quatros pontos estabelecidos, os dez animais eram separados aleatoriamente na chegada do estabelecimento, onde se procedia a marcação de zero a nove com tatuagem na região dorsal anterior esquerda dos animais.

TABELA 1. Amostras coletadas, considerando etapas de criação, abate e processamento, com indicação da metodologia de amostragem e quantidade de amostras.

Local	Etapas	Amostra / fase	Unidade amostral	n
Granja	Terminação	Piso baia terminação	<i>overshoes</i> *	10
Abatedouro	Abate	Piso pocilga espera	<i>overshoes</i> *	10
		Carcaça após sangria	400 cm <sup>2</sup>	100
		Carcaça após chamuscamento	400 cm <sup>2</sup>	100
		Carcaça após evisceração	400 cm <sup>2</sup>	100
		Carcaça após lavagem	400 cm <sup>2</sup>	100
		Mãos de manipuladores (limpas)	400 cm <sup>2</sup>	10
		Mãos de manipuladores (durante processo)	400 cm <sup>2</sup>	10
	Processo	Mesa de manipulação (limpa)	400 cm <sup>2</sup>	10
		Mesa de manipulação (durante processo)	400 cm <sup>2</sup>	10
		Faca (limpa)	4 unid.	10
		Faca (durante processo)	4 unid.	10
		Mãos de manipuladores (limpas)	400 cm <sup>2</sup>	10
		Mãos de manipuladores (durante processo)	400 cm <sup>2</sup>	10
		Produto final	400 cm <sup>2</sup>	40

\*Conforme descrito por Botteldoorn *et al.* (2003).

Ainda no abatedouro frigorífico foram coletadas amostras de piso das pocilgas com os animais já descarregados; equipamentos, utensílios e

instalações do ambiente de abate e processamento em dois momentos: antes do início das atividades e durante as atividades; cortes cárneos finais (Tabela 1).

As amostras obtidas de carcaças, cortes e superfícies foram coletadas com esponjas estéreis pré-umedecidas (10 ml de NaCl 0,85% por esponja) em quatro áreas delimitadas por moldes estéreis de 10 x 10 cm (100 cm<sup>2</sup>) totalizando 400 cm<sup>2</sup>. Cada amostra superficial de utensílio foi composta por um “pool” de quatro unidades, também coletada com esponjas estéreis pré-umedecidas; especificamente em relação às carcaças, os pontos amostrados são os apresentados na Figura 1.

Todas as amostras coletadas foram acondicionadas em recipientes isotérmicos e mantidas sob refrigeração até o momento das análises laboratoriais, análises microbiológicas foram processadas no Laboratório LACOMA na UFPR Palotina/PR e o perfil de resistência aos antimicrobianos e a PCR no Laboratório de Microbiologia da UFV em Viçosa/MG.

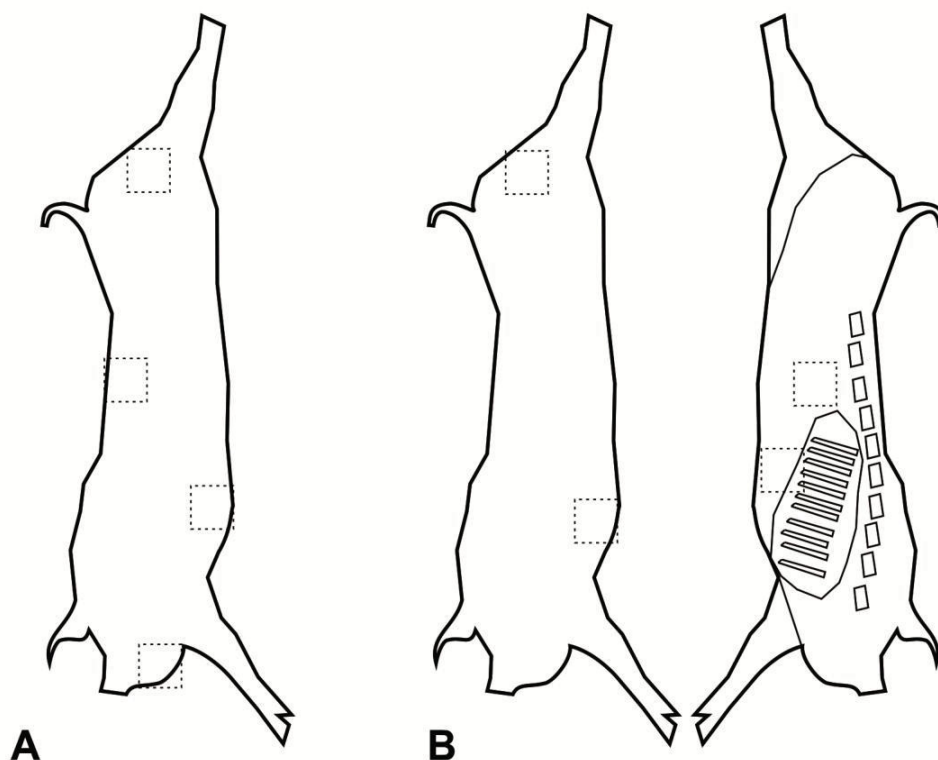


Figura 1. Representação esquemática de carcaça suína - carcaça inteira (A) e meia carcaça (B), com indicação dos locais que foram amostrados com auxílio de esponjas estéreis em áreas delimitadas em 100 cm<sup>2</sup> (quadrados pontilhados).

## 4.2 CONTAGEM DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVA E CONFIRMAÇÃO DE *S. AUREUS*

A enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) foi realizada conforme protocolo ISO 6888-2. As amostras superficiais obtidas foram diluídas em escala seriada decimal em solução salina a 0,9%(m/v) (Oxoid), em seguida alíquotas de 0,1ml das amostras foram semeadas em ágar fibrinogênio plasma de coelho (RPFA - bioMérieux), por espalhamento em superfície.

As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, quando colônias típicas de SCP (coloração acinzentada e presença de halo de fibrina ao redor) foram observadas e enumeradas. Os resultados obtidos foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por cm<sup>2</sup> ou unidade (piso ou faca).

Para pesquisa de *S. aureus*, duas e quatro colônias típicas de foram selecionadas por amostra, purificadas e semeadas em caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid), com incubação a 37°C por 24 horas, seguida de transferência para microtubos e adicionadas de glicerol a 20% (v/v), para congelamento e utilização em etapas posteriores.

Para caracterização fenotípica de *S. aureus*, os isolados foram caracterizados quanto a fermentação do manitol a 7,5% de NaCl, produção de catalase, termonuclease e coloração de Gram (KONEMAN, 2005).

Todos os isolados que apresentaram perfil bioquímico compatível com *S. aureus* foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação pela detecção do gene *femA*, exclusivo dessa espécie (MEHROTRA *et al.*, 2000).

Para a extração do DNA os cultivos foram semeados overnight a 37°C em caldo TSB e 400µl da cultura foi alíquotada em tubo, que foi centrifugado a 4.000 rpm durante 5 minutos, após o descarte do sobrenadante, ocorreu a adição de 1ml de água MiliQ autoclavada, novamente levado a centrifugação a 4.000 rpm durante 5 minutos e descartado novamente o sobrenadante, mesmo tubo foi acrescido 150µl de água *nuclease free* mais 150µl de Chelex 100 (10%), levado a incubação a 100°C por 20 minutos, em seguida centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos, devendo guardar o sobrenadante. Assim, cada isolado selecionado possuirá como material genético para testes moleculares o DNA total e o DNA

plasmidial. Os primers utilizados para detecção do gene *femA* estão descritos na Tabela 3, e o protocolo utilizado foi o descrito por Dias *et al.* (2011).

Após a extração do DNA foi realizado a PCR para detecção do gene *femA* nas 20 culturas de SPC isoladas e confirmadas nos estes fenotípicos e bioquímicos. Esse gene é utilizado para realizar a confirmação de espécie de *S. aureus*. O gene *femA* gera um produto de 132 pb com desnaturação a 95°C/30s, anelamento a 53°C/30s e extensão a 72°C/30s.

#### **4.3 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DAS CULTURAS DE *S. AUREUS* QUANTO A RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS**

Os isolados identificados como *S. aureus* foram avaliados quanto à resistência a diferentes antibióticos, pelo teste de susceptibilidade na concentração do *breakpoint* (BAE *et al.*, 2005), onde foi considerada uma concentração fixa do antimicrobiano avaliado, determinado de acordo com os limites de resistência estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016).

Alíquotas dos isolados foram transferidas para TSB, e incubados a 37°C por 24h. Em seguida foram transferidas alíquotas de 20 µL de cada cultura para um dos poços de uma placa de micro titulação (96 poços), contendo previamente caldo TSB (180 µl por poço).

Na placa de micro titulação, um poço foi reservado para inoculação de caldo TSB (controle de contaminação), e um poço para inoculação de um isolado previamente descrito como sensível ao antibiótico a ser testado (controle negativo).

Como controle positivo foi utilizada a cepa *S. aureus* ATCC 29213, conforme recomendações do CLSI (2016). A placa de micro titulação foi incubada a 37°C por 24 horas.

Após incubação, as culturas das placas de micro titulação foram transferidas, com o auxílio de um replicador de placas (pin-replicador), para placas de petri de 150 mm de diâmetro contendo ágar Mueller-Hinton, suplementado com diferentes concentrações de cada antibiótico conforme descrito na Tabela 2 e novamente incubadas a 37 °C por 24 horas.



O crescimento bacteriano no local inoculado indicou resistência do isolado frente ao antimicrobiano testado. Desta forma foram classificados os isolados como resistentes ou sensíveis aos diferentes antibióticos testados.

TABELA 2. Antibióticos e as concentrações utilizadas em ensaios de identificação de resistência por isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos em cadeia produtiva de carne suína por meio da metodologia do *breakpoint* (BAE *et al.*, 2005).

Classe	Antimicrobiano	Concentração
Penicilinas	Oxacilina (metilina) - OXA	4 µg/mL
	Penicilina - PEN	0,250 ug/mL
Glicopeptídeos	Vancomicina - VAN	16 µg/mL
Tetraciclina	Tetraciclina - TET	16 µg/mL
Macrolídeos	Eritromicina - ERI	8 µg/mL
Aminoglicosídeos	Gentamicina - GEN	16 µg/mL
Sulfonamidas	Sulfamethoxazole - SUL	16 µg/mL
Fenicolis	Cloranfenicol - CLO	32 µg/mL
Ansamícinas	Rifampicina - RIF	4 µg/mL
Quinolonas	Ciprofloxacina - CIP	4 µg/mL

Obs.: Classe, antimicrobianos e concentrações definidas de acordo com o CLSI (2016).

Todos os testes foram realizados em triplicata e uma placa com ágar Mueller-Hinton sem antibiótico foi utilizada para verificação da viabilidade das cepas avaliadas.

Estes mesmos isolados em continuidade ao estudo foram submetidos identificação molecular onde foi realizada à PCR para detecção de genes associados a resistência a antibióticos.

Para avaliar o perfil genético de resistência das cepas foi verificado a partir da pesquisa dos seguintes genes: *femB*, *blaZ*, *mecA*, *mecC*, *vanA*, *tetK*, conforme os primers estão apresentados na Tabela 3.

Todas as reações de PCR foram realizadas com o volume final de 16 µL, composto por 8 µL do Gotaq® Green Master Mix, 0,60 µL de cada primer F e R (200 nMol), 4,8 µL de água nuclease free e 2 µL de DNA da amostra (concentração mínima: 40 ng/µL). O tampão de corrida utilizado foi o Tris-borato-EDTA gel (TBE) a 0,5X em gel de agarose a 2% a correr a 100 volts durante 90 minutos. Como marcador molecular foi utilizado 100 bp (Promega).



TABELA 3. Genes de resistência pesquisados, sequências de nucleotídeos dos *primers* e características das reações de PCR utilizadas para definição do perfil de resistência a antibióticos em isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos na cadeia produtiva de carne suína.

Gene	Sequência Produto (pb)	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Referência
<i>femA</i>	F - AAAAAAGCACATAACAAGCG 132 R - GATAAAGAAGAAACCAGCAG	95°C/30s	53°C/30s	72°C/30s	Dias <i>et al.</i> , 2011 (a)
<i>femB</i>	F - TTACAGAGTTAACTGTTACC 651 R - ATACAAATCCAGCACGCTCT	95°C/30s	53°C/30s	72°C/150s	Pérez-Roth, 2001 (b)
<i>mecA</i>	F - AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC 533 R - AAAATCGATGGTAAAGTTGGC	95°C/30s	52°C/30s	72°C/60s	Lee, 2003 (mod.) (c)
<i>vanA</i>	F - ATGGCAAGTCAGGTGAAGATGG 399 R - TCCACCTCGCCCAACAACCTAACG	94°C/25s	52°C/40s	72°C/50s	Woodford <i>et al.</i> , 1993 (d)
<i>blaZ</i>	F - AGAGATTTGCCTATGCTTC 516 R - CTTGACCACTTTTATCAGC	94°C/60s	54°C/60s	72°C/60s	Vesterholm-Nielsen <i>et al.</i> , 1999 (e)
<i>mecC</i>	F - GAAAAAAGGCTTAGAACGCCCTC 138 R - GAAGATCTTTTCCGTTTTCAGC	94°C/60s	54°C/60s	72°C/60s	Vesterholm-Nielsen <i>et al.</i> , 1999 (f)
<i>tetK</i>	F – GTAGCGACAATAGGTAATAGT 360 R – GTAGTGACAATAAACCTCCTA	94°C/30s	55°C/30s	72°C/30s	Strommenger <i>et al.</i> , 2003 (g)

(a) PCR com desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos  
(b) PCR com desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 5 minutos  
(c) PCR com desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos  
(d) PCR com desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos  
(e) e (f) PCR com desnaturação inicial de 94°C por 7 minutos, 40 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 7 minutos  
(g) PCR com desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, extensão final foi feita a 72°C por 30 segundos.  
F – forward R - reverse

O gel de eletroforese foi corado com GelRed (Biotium, Inc., Fremont, CA, EUA) e fotografado usando o programa Image LPix através do aparelho de Biotecnologia Loccus L.PixR Imagem Molecular. Como marcador do peso molecular, foi utilizado o geneRuler 100 bp DNA ladder (Promega).

Para os genes *mecA* que foram detectados por PCR, repetindo o descrito por Dias *et al.* (2011). O volume final da reação da PCR foi de 16 µL, composto por 8 µL de GoTaq® Green Master Mix, 0,6 µL de cada primer (25 pmol / L), 4,8 µL de *água nuclease free* e 2 µL de DNA molde (50-100 ng: DNA total e DNA plasmidial). A amplificação foi realizada em um termociclador configurado com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 57°C durante 2 minutos e extensão a 72°C, durante 2 minutos), terminando com a extensão final a 72°C durante 10 minutos. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-borato-EDTA gel (TBE) a 0,5X em gel de agarose a 2% a correr a 100 volts durante 90 minutos. Como marcador molecular foi utilizado 100 bp DNA Ladder PromegaR. O gel de eletroforese foi corado com GelRed e fotografado usando o programa Image LPix através do aparelho de Biotecnologia Loccus L.PixR Imagem Molecular.

A amplificação do gene *vanA* foi realizada conforme descrito por Woodford *et al.*, (1993): O volume final da reação da PCR foi de 16 µL, composto por 8 µL de GoTaq® Green Master Mix, 0,6 µL de cada primer (25 pmol / L), 4,8 µL de *água nuclease free* e 2 µL de DNA molde (50-100 ng: DNA total e DNA plasmidial). A amplificação foi realizada conforme o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C durante 25 segundos, hibridação a 52°C durante 40 segundos e extensão a 72°C, durante 50 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos). Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose e corados com GelRed. Como marcador do peso molecular, foi utilizado o geneRuler 100bp DNA ladder.

A detecção do gene *tet(k)* foi realizada por PCR convencional, conforme protocolo descrito por Strommenger *et al.* (2003). O volume final da reação da PCR foi de 16 µL, composto por 8 µL de GoTaq® Green Master Mix, 0,6 µL de cada primer (25 pmol / L), 4,8 µL de *água nuclease free* e 2 µL de DNA molde (50-100 ng: DNA total e DNA plasmidial). A amplificação foi realizada por

desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 55°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 30 segundos. Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose e corados com GelRed. Como marcador do peso molecular, foi utilizado o geneRuler 100bp DNA ladder.

A detecção do gene *blaZ* foi realizada por PCR convencional, conforme protocolo descrito por Vesterholm-Nielsen *et al.*, 1999. O volume final da reação da PCR foi de 16 µL, composto por 8 µL de GoTaq® Green Master Mix, 0,6 µL de cada primer (25 pmol / L), 4,8 µL de *água nuclease free* e 2 µL de DNA molde (50-100 ng: DNA total e DNA plasmidial). A amplificação foi realizada por desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 55°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 30 segundos. Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose e corados com GelRed. Como marcador do peso molecular, foi utilizado o geneRuler 100bp DNA ladder.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado das contagens (UFC/cm<sup>2</sup>) de *Staphylococcus coagulase positiva* e a confirmação de *Staphylococcus aureus* por tipo de amostra está descrito na Tabela 4.

Considerando o universo de 540 amostras que permitiram contagem, 527 ficaram abaixo do limite de detecção e apenas 80 colônias apresentaram características típicas e atípicas de crescimento para *Staphylococcus*. Destas foram selecionadas (2 a 3 colônias típicas e atípicas por amostra), que após serem purificadas para confirmação fenotípica e bioquímica resultou em 20 (25%) isolados para SCP, destes isolados 18 (22,5%) foram identificados como *S. aureus*, pela detecção do gene *femA* (Tabela 4). Em estudo similar, Masson (2012) coletou 458 amostras na cadeia produtiva de suínos e isolou 103 SCP, dos quais 81 (79%) foram identificados como *S. aureus* pela detecção do gene *femA*.

Na Tabela 4 estão os resultados obtidos para a contagem de SCP e *S. aureus* que foram inferior a 2 log UFC por cm<sup>2</sup> (limite de detecção pelo método utilizado) em 530 amostras (98,2%). Contagens entre 2-3 log UFC foram obtidas em carcaça após a sangria e as demais contagens obtidas superiores a 4 log UFC foram observadas em pisos de baias de terminação e de pocilgas de espera. Em três amostras (0,5%) foram obtidas do piso da baia de terminação, cinco (0,9%) obtidas do piso das pocilgas de espera no frigorífico, duas (0,3%) de origem da carcaça no ponto A (após a sangria), outras três (0,5%) oriundas das mãos dos manipuladores da área de abate (limpas e durante o processo) e da área de processamento (mãos limpas) (Tabela 4), mostrando a possibilidade de que as culturas possam ter se originado nas propriedades disseminando-se para a linha do abate e manipuladores. Demais locais de coleta não apresentaram contagem para SCP.

As pocilgas de espera apresentaram maior variação no nível de contaminação por SCP: 40% das amostras apresentaram contagem > 5 logs UFC/cm<sup>2</sup>, 10% entre 4 - 5 logs UFC/cm<sup>2</sup> e 50% contagens foram inferiores a 2 logs UFC/cm<sup>2</sup> dentro dos limites de aceitação (Tabela 4). Entendendo-se que o piso é de material antiderrapante visando atender ao bem-estar animal (BRASIL, 2018), pode ter justificado o maior isolamento de SCP, pela dificuldade de se realizar uma adequada higienização do piso devido a reentrâncias presentes no concreto e até formação de biofilme (TONDO; BARTZ, 2012). A origem do SCP e *S. aureus* podem advir das granjas de terminação, como confirmado pelo estudo de Linhares et al. (2015), onde demonstraram que suínos encaminhados ao abatedouro abrigavam esta bactéria em seu intestino e as excretavam nas pocilgas durante a espera anterior ao abate.

A contagem de SCP e *S. aureus* nas carcaças de suíno foi detectada apenas após a sangria cujos valores obtidos foram semelhantes ao encontrado no estudo de Lima et al. (2004), que avaliou a presença de *S. aureus* na superfície de suínos em diferentes etapas do abate no estado de Minas Gerais, onde as amostras apresentaram contagens variando de 1,56 a 1,70 log UFC/cm<sup>2</sup>.

TABELA 4. Faixas de contaminação nas diferentes etapas de produção, e a frequência encontrada para *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) após testes fenotípicos e bioquímicos, e confirmação do *S. aureus* através do gene *femA* no total de 540 amostras obtidas na cadeia produtiva de carne suína, Paraná, Brasil.

Local	Etapa	Amostra	n	Faixas de contaminação por (log UFC/cm <sup>2</sup> ou g)					SCP		<i>S. aureus</i>	
				< 2	2 - 3	3 - 4	4 - 5	> 5	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Granja Abatedouro	Terminação	Piso baia terminação	10	7	0	0	0	3	3 (30,0)	3 (30,0)	3 (30,0)	3 (30,0)
	Abate	Piso pocilga espera	10	5	0	0	1	4	10 (100,0)	9 (90,0)	9 (90,0)	9 (90,0)
		Carcaça após sangria	100	98	2	0	0	0	7 (7,0)	6 (6,0)	6 (6,0)	6 (6,0)
		Carcaça após chuscamento	100	100	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		Carcaça após evisceração	100	100	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		Carcaça após lavagem	100	100	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		Mãos manipuladores (limpas)	10	10	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		Mãos manipuladores (durante processo)	10	10	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Processamento	Mesa manipulação (limpa)	10	10	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		Mesa manipulação (durante processo)	10	10	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		Faca (limpa)	10	10	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		Faca (durante processo)	10	10	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		Mãos manipuladores (limpa)	10	10	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Produto final		Mãos manipuladores (durante processo)	10	10	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		Produto final	40	40	0	0	0	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total			540	530	2	0	1	7	20 (25%)	18 (22,5%)	18 (22,5%)	18 (22,5%)

A contaminação em carcaça após a sangria indica que as condições microbiológicas destas dependem de vários fatores como: higiene das granjas, dos caminhões, das pocilgas de espera além da adequada higienização dos suínos antes do abate. Ocorrência de falhas em alguma destas etapas favorecem a disseminação de patógenos e micro-organismos indicadores de higiene dentro do frigorífico e consequente contaminação cruzada relatados em estudos de Santos *et al.* (2013) e Flores (2015).

Nas demais etapas após a sangria como chamuscamento (B), evisceração (C) e lavagem (D) não foram obtidas as contagens de SCP. Masson (2012) detectou SCP em diferentes pontos e etapas do abate de suínos, incluindo a escaldagem, o chamuscamento e a refrigeração que segundo VAN CLEEF *et al.*, (2010) tendem a aumentar ao longo do dia e se disseminar a outros pontos, o que não foi verificado na presente pesquisa, onde ficou demonstrado que a escaldagem e chamuscamento foram importantes para o controle de SCP no abate e processamento da carne suína, a etapa de chamuscamento foi fator determinante no controle da contaminação, visto que nas etapas seguintes do abate não foi isolado o patógeno em questão.

Das amostras positivas, as baias de terminação foram as que apresentaram menores prevalências de contaminação por *S. aureus* e SCP: 30% das amostras das baias (Tabela 4), o que era esperado, pois mesmo estando presente naturalmente nestes animais, são um mau competidor, e podem ter seu desenvolvimento prejudicado. Suínos infectados, provavelmente, são as importantes fontes de infecções para outros suínos (TAYLOR, 1999). Entretanto, a distribuição de espécies do gênero é bem diversificada, uma vez que SCP e *S. aureus* já foram isolado de fezes, alimentos, água, piso e paredes de baias, aerossóis, articulações, pele, cavidade oronasal, traqueia, prepúcio, vagina, intestino (LEE, 2003) e lavados alveolares (GANTER *et al.*, 1990).

A contagem de SCP e *S. aureus* nos utensílios (facas) e produto final com valores abaixo do limite de detecção ( $< 2\text{UFC por cm}^2$ ), já Masson (2012) avaliou utensílios e o ambiente da desossa durante o processamento e seus achados foram superiores aos obtidos no presente estudo (Tabela 4).

Nas baias de terminação considerando os três isolados obtidos para SCP, 100% foram confirmados para *S. aureus*. Nos sete isolados pesquisados referentes a carcaça após a sangria, em seis (85%) foram confirmados para o

gene específico. Em um estudo de Lima *et al.*, (2004) os pesquisadores encontraram 11,7% das carcaças de suínos contaminadas com *S. aureus*, onde o aumento da frequência deste micro-organismo em carcaças indica possíveis falhas higiênicas durante as diferentes etapas do processo de abate e/ou por equipamentos e utensílios contaminados. Dos dez isolados obtidos das pocilgas de espera 9 (1,7%) confirmaram a presença do gene *femA*.

A enumeração de SCP é reconhecida internacionalmente como um padrão microbiológico de segurança de alimentos e importante indicador das condições higiênico-sanitárias da sua produção e conservação. A sua relação com as condições higiênico-sanitárias dos alimentos está ligada ao fato de que os principais reservatórios naturais são os humanos e os animais, na pele, mucosas e, principalmente, no trato nasofaríngeo de portadores assintomáticos (TONDO; BARTZ, 2012).

Independentemente das contagens obtidas, um fator a ser considerado é a respeito da transferência de genes de resistência que pode ocorrer mesmo quando há baixas concentrações do agente no ambiente ou em alimentos (GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014).

### 5.1 Resistência a antimicrobianos - Perfil fenotípico e genotípico

Das 18 culturas de *S. aureus* confirmadas pela PCR para presença do gene *femA* conforme Figura 2, foi possível traçar o perfil de resistência dos isolados por caracterização fenotípica, considerando as concentrações indicadas para o teste do *Breakpoint* segundo o CLSI (2016), obtidos através da realização testes de resistência a antimicrobianos e pela pesquisa genotípica através da PCR de genes relacionados a resistência.



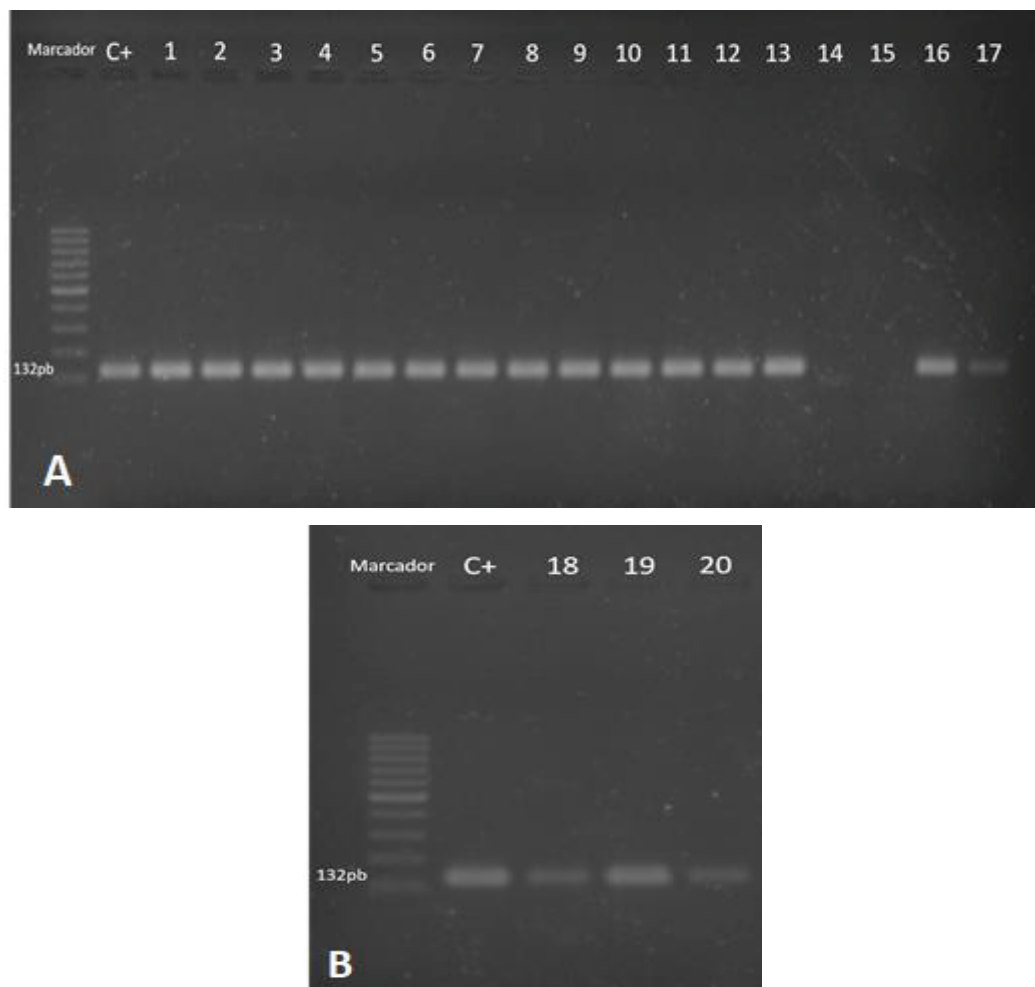


FIGURA 2: Amplificação do gene *femA* com produto de 132pb: (A) amostras de 1-17, (B) amostras de 18-20.

Considerando os resultados fenotípicos, 100% dos isolados de *S. aureus* apresentaram resistência a sulfamethoxazole (SUL), a penicilina (PEN), a eritromicina (ERI) e a tetraciclina (TET). Apenas três isolados (16,6%) mostraram resistência a oxacilina (OXA), com relação à vancomicina (VAN) e a rifampicina (RIF) todas as amostras foram sensíveis (Tabela 5), o que difere do estudo realizado em São Paulo (SP) por Arantes *et al.* (2013), que evidenciaram 82,4% das cepas isoladas resistentes a eritromicina e 65,9% resistentes a tetraciclina; 94,40% a ciprofloxacina (CIP) e ao cloranfenicol (CLO). O que difere do outro estudo realizado em Tulsa, Oklahoma (EUA) por Abdalrahman *et al.* (2015), relataram que 19,7% dos isolados apresentaram resistência a Ciprofloxacina, 28,9% à gentamicina, 7,9% ao cloranfenicol e 2,6% ao sulfazotrim em carnes suínas e bovinas, sendo estes princípios relacionados com o maior uso dentro da suinocultura.



Após da confirmação do gene *femA*, um total de três (16,6%) dos 18 isolados apresentaram o perfil fenotípico para resistência a oxacilina no teste de *breakpoint*, e no perfil genotípico 9 (50%) destes isolados amplificaram o gene *mecA* (Anexo 1), dos quais a maioria foi identificada em 5 isolados da carcaça após a sangria (55,5%). As que não confirmaram para o gene, apresentaram bandas inespecíficas podendo ser dímeros de primer, que é resultado do anelamento do primer em outra porção do genoma (Figura 2). Mecanismo que envolve a produção de uma transpeptidase (proteína de ligação à penicilina), modificada, a PBP2a, codificada pelo gene *mecA* que confere resistência à meticilina (KATAYAMA *et al.*, 2005). WIELDERS *et al.*, (2002) apresentam dados moleculares que suportam a teoria de que a transferência do gene *mecA* entre linhagens de *Staphylococcus* spp., permitindo o aparecimento de clone de *S. aureus* resistente Meticilina (MRSA) disseminado pelo mundo, e de que essa disseminação pode ser favorecida pela pressão seletiva oriunda do uso indiscriminado de antimicrobianos.

Na PCR para o gene *tetK*, onde nenhuma das cepas analisadas apresentou o gene pesquisado (Anexo 2). Porém não condiz com o encontrado no *Breakpoint*, onde estes isolados apresentaram resistência antimicrobiana a tetraciclina (Tabela 5), fator relacionado a heterorresistência genética. Estes genes caracterizam a resistência à tetraciclina: *tetK*, *tetM*, *tetO* e *tetL* são quatro genes principais associados resistência à tetraciclina entre bactérias Gram positivas.

Os genes *tetK* e *tetL* codificam para proteínas de efluxo, estes são a energia das proteínas associadas à membrana dependentes que impedem a acumulação de tetraciclina dentro da célula, estas proteínas exportadoras estão associadas às proteínas de membrana cuja a síntese é codificada pelo gene *tet* (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001). Esses genes estão em sua maioria associados a plasmídeos, transposons e integrons. Por estarem ligados a elementos móveis, esses genes estão amplamente disseminados em várias espécies bacterianas. Além disso, são frequentemente associados com multirresistência bacteriana (VRIES *et al.*, 2009).

TABELA 5. Frequência de resistência a diferentes antimicrobianos e presença de genes relacionados a resistência a diferentes antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos em diferentes etapas da cadeia produtiva de carne suína, Paraná, Brasil.

Local	Etapa	Amostra	N	Resistência antimicrobiana (breakpoint)												Genes				
				OXA	PEN	VAN	GEN	ERI	TET	CIP	SUL	CLO	RIF	femB	mecA	mecC	blaZ	vanA	tetK	
Granja	Terminação	Piso baia terminação	3	0	3	0	3	3	3	3	3	3	3	0	0	2	0	2	0	0
	Abatedouro	Abate	Piso pocilga espera	9	1	9	0	8	9	9	9	9	9	0	1	2	0	7	0	0
			Carcça após sangria (A)	6	2	6	0	5	6	6	5	6	5	0	4	5	0	6	0	0
Total			18	3	18	0	16	18	18	17	18	17	0	5	9	0	15	0	0	0

FONTE: Dados da pesquisa. OXA: Oxacilina (metililina), PEN: Penicilina, VAN: Vancomicina, GEN: Gentamicina, ERI: Eritromicina, TET: Tetraciclina, CIP: Cipprofloxacina, SUL: Sulfametoxazole, CLO: Cloranfenicol RIF: Rifampicina. (A) Carcaça após sangria.

Em medicina veterinária as tetraciclina são usadas desde 1950, sendo as famílias mais utilizadas a oxitetraciclina, clortetraciclina e doxicilina. Estudo realizado em 2010 sobre o uso de antimicrobianos na produção leiteira em um município de Santa Catarina demonstrou que as tetraciclina representaram 36% de todos os antibióticos utilizados (KORB *et al.*, 2011).

Da mesma forma, a PCR realizada para pesquisa e confirmação do gene *vanA* nas 18 cepas de *S. aureus*, todas as amostras foram negativas para esse gene de resistência, de acordo com o que foi observado no teste de *Breakpoint* para resistência à vancomicina (Anexo 3). Esse percentual equivale ao encontrado por Tahnkiwale *et al.*, (2002) que não detectaram resistência à vancomicina em 230 isolados de *Staphylococcus* spp., em concordância com o encontrado no teste de resistência à vancomicina realizado. Já nos estudos de Tiwari & Sen (2006) encontraram resistência fenotípica ao fármaco pesquisado, porém não encontraram os genes *vanA* e *vanB*.

Para o gene *mecC*, todas foram negativas, apesar de aparecerem bandas inespecíficas (Anexo 4), estas sendo dímeros de primer, não é possível afirmar que seja positivo para o gene pesquisado, pois apresentou-se de forma muito sutil na imagem. O gene *mecC* também codifica proteínas de membrana que permitem a formação do peptidoglicano, conferindo resistência.

Do piso da baia na granja, foram obtidos três (16,6%) isolados, os quais todos apresentaram perfil de resistência a sete antimicrobianos avaliados, dentre os três isolados nenhum apresentou fenótipo para resistência a oxacilina (OXA), porém o gene *mecA*, que carrega esta característica foi identificado em dois destes isolados (Tabela 5), mostrando que apesar deste gene ser o principal fator de resistência à meticilina, existem elementos reguladores, como o *mecRI-mecI*, que são capazes de permitir ou não a expressão de genes de resistência, mas que não estão necessariamente presentes em todas as cepas que possuem *mecA*, ou seja, a resistência fenotípica à oxacilina é extremamente variável e depende da expressão do gene *mecA*. Estes genes *mecA* e *mecC* foram denominados de *mecALGA251*, estão localizados dentro de um elemento *SCCmec*, sendo submetido ao Grupo de Trabalho sobre a Classificação do *SCCmec* e classificado em 2009 como *SCCmec* tipo XI. Em 2012, o *mecALGA251* foi denominado de *mecC* (MENDONÇA *et al.*, 2012).

Essa variabilidade é reconhecida como heterorresistência fenotípica, e se caracteriza pelo fato de que de toda população bacteriana heterogeneamente resistente, assim como todas as células, carregam o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência, porém nem todas expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma. Sua expressão fenotípica codificada será afetada por vários fatores, incluindo pH, temperatura e osmolaridade (MARTY *et al.*, 1987). Este resultado condiz com o que está na literatura que é possível encontrar diferentes prevalências de MRSA, em países asiáticos, conforme estudo onde Baba e colaboradores estudo no Japão (2010) encontraram a prevalência de 0,9% e na Malasia, Neela et al. 2009, obtiveram uma prevalência de 1,38% o que contrasta com os índices encontramos no continente Europeu e Americano, frequências muito mais altas como 49% na Alemanha (TENHAZEM *et al.*, 2009), e os Estados Unidos com 36% (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014).

O gene *blaZ*, foi identificado em 15 (83,3%) amostras (Anexo 5), contudo foram observados 100% dos isolados resistentes no teste de *Breakpoint* a penicilina. Frequência considerada elevada, considerando um dos antibacterianos amplamente utilizados na suinocultura, a penicilina. O que também foi descrito nos estudos realizados por Bania (2006), onde encontraram em 92% das cepas isoladas amplificaram o gene *blaZ*. No piso da pocilga de espera, foram identificados nove (50%) isolados *S. aureus*, dos quais apenas um (11,1%) apresentou a característica fenotípica de resistência a Meticilina, e no perfil genotípico gene *mecA* foi identificado em dois destes isolados. O gene *blaZ* foi encontrado em sete isolados, contudo o perfil fenotípico de resistência foi identificado nos nove isolados para penicilina (Tabela 6). Importantes mecanismos conferem resistência aos beta-lactâmicos em estafilococos (OLSEN; CHRISTENSEN; AARESTRUP, 2006). O mais importante é a produção de beta-lactamase, mediada pelo gene *blaZ*, que inativa a penicilina por hidrólise do anel beta-lactâmico (TAPONEN; PYORALA, 2009). Sendo gene responsável pela codificação de betalactamases em *S. aureus*, para expressão são organizados em um grupo *blaZ*-*blaR1*-*blaI*, que codifica respectivamente *blaZ* (betalactamase), *blaI* repressor e *blaR1* anti-repressor, tal gene pode estar presente no cromossomo, em plasmídeos ou em transposons (LIU *et al.*, 2007).

Para a pesquisa do gene *femB*, 4 (22,2%) foram positivas (Anexo 6), referentes a pocilga de espera e carcaça após sangria, as quais também foram resistentes no *Breakpoint* a oxacilina, remetendo resistência a meticilina (Tabela 5). O gene *femB*, além de ser exclusivo de *S. aureus*, codifica um fator essencial para a resistência à meticilina (PÉREZ-ROTH et al., 2001). Estes *femA* e *femB* ocorrem de forma natural genes em *S. aureus*, de tal maneira em cepas resistentes como em susceptíveis, sendo importante para a determinação da resistência a oxacilina (HURLIMANN-DALEL et al, 1992). Esses resultados demonstram a grande heterogeneidade e variedade genética envolvida na expressão fenotípica da resistência a meticilina. A elevada variabilidade dos padrões fenotípicos e genotípicos pode decorrer ainda da diversidade dos locais nos quais os *S. aureus* são encontrados, uma vez que estes microrganismos podem ser isolados de diferentes etapas na cadeia e até mesmo nas mãos e fossas nasais de portadores humanos (BRAMLEY & DODD, 1984; ROBERSON et al. 1994; 1998).

Nas amostras de carcaça após a sangria, foi conseguido isolar seis cepas de *S. aureus*, dos quais dois apresentaram o fenótipo de resistência para oxacilina, mas apenas cinco isolados amplificaram o gene *mecA*, para o fenótipo de resistência a penicilina todos os isolados foram confirmados geneticamente através do gene *blaZ*, e destes quatro isolados apresentaram o gene *femB* o qual caracteriza perfil de resistência a meticilina (Tabela 6). A resistência bacteriana é estabelecida devido à grande mutação que pode ocorrer em curto espaço de tempo, somado com as alterações genéticas e combinações entre bactérias, a Tabela 6 também apresentou a frequência de resultados positivos para genes relacionados a resistência do *S. aureus* frente a diferentes antimicrobianos. Dessa forma, a identificação deste agente é um fator determinante que deve ser somado à correta aplicação de protocolos terapêuticos utilizados na produção animal, em especial na suinocultura.

TABELA 6 - Correlação entre resultados fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos do *Staphylococcus aureus*.

Nº	Cep a	Local coleta	Resistência a antimicrobianos (Breakpoint)				Genes de resistência (PCR)											
			OXA	PEN	VAN	GEN	ERI	TET	CIP	SUL	CLO	RIF	femB	mecA	mecC	blaZ	vanA	tetK
01	13	Carcaça (A)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
02	14	Carcaça (A)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
03	15	Carcaça (A)	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
04	16	Carcaça (A)	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
05	24	Carcaça (A)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
06	28	Carcaça (A)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
07	45	Pocilga de espera	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
08	46	Pocilga de espera	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
09	47	Pocilga de espera	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
10	51	Baia terminação	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
11	52	Baia terminação	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
12	53	Pocilga de espera	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
13	55	Pocilga de espera	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
14	77	Pocilga de espera	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
15	78	Pocilga de espera	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
16	79	Pocilga de espera	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
17	80	Pocilga de espera	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
18	71	Baia Terminação	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Total			3	18	0	16	18	18	17	18	17	0	5	9	0	15	0	0

FONTE: Dados da pesquisa.

Este fato denota a importância de uma maior vigilância epidemiológica nas granjas e abatedouros quanto a pesquisa de *S. aureus* e dos fenótipos de resistência, desde que comumente além da resistência aos beta-lactâmicos estas estirpes são resistentes a outras classes de antimicrobianos, apresentando multirresistência, que dificulta a terapêutica das infecções causadas por estes agentes e cuja disseminação para humanos se apresenta como uma realidade (RINCON et al., 2014). Assim a resistência bacteriana aos compostos antimicrobianos utilizados na terapia humana e animal, bem como na alimentação suína como promotores de crescimento, tornou-se uma preocupação de saúde pública mundial.

Considerando o perfil de resistência frente aos 10 antimicrobianos testados, os 15 (83,3%) isolados foram resistentes aos antimicrobianos testados, sendo que foram obtidas quatro combinações de resultados de acordo com a resistência encontrada, onde: 3 (16,7%) dos isolados (pocilga e carcaça) apresentaram resistência a oito antimicrobianos; 13 (72,2%) dos isolados (baia, pocilga e carcaça) apresentaram resistência a sete antibióticos; um (5,5%) isolado referente a pocilga de espera foi resistente seis antimicrobianos; e um (5,5%) isolado de origem da carcaça apresentou resistência a quatro antimicrobianos (Tabela 7).

TABELA 7. Perfil de resistência a diferentes antibióticos por 18 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos da cadeia produtiva de carne suína. Resultados fenotípicos obtidos por teste de susceptibilidade considerando as concentrações indicadas para o *breakpoint* (CLSI, 2016).

Perfil fenotípico *	n	Origem
8 : OXA-PEN-GEN-ERI-TET-CIP-SUL-CLO	3	Pocilga, carcaça (A)
7 : PEN-GEN-ERI-TET-CIP-SUL-CLO	13	Baia, pocilga, carcaça (A)
6 : PEN-ERI-TET-CIP-SUL-CLO	1	Pocilga
4 : PEN-ERI-TET-SUL	1	Carcaça (A)

FONTE: Dados da pesquisa. \*número de antimicrobianos, OXA: Oxacilina (metilicina), PEN: Penicilina, VAN: Vancomicina, GEN: Gentamicina, ERI: Eritromicina, TET: Tetraciclina, CIP: Ciprofloxacina, SUL: Sulfametoxazole, CLO: Cloranfenicol, RIF: Rifampicina. (A) Carcaça após a sangria.

Nos isolados de *S. aureus* que apresentaram multirresistência aos antibióticos testados, que foi caracterizada pela presença de resistência a quatro ou mais classes de agentes antimicrobianos a partir do teste. Neste estudo

observamos uma frequência elevada de multirresistência nas 18 culturas de *S. aureus* (Tabela 7), sendo um resultado relevante, pois indica o possível comprometimento da eficácia dos fármacos utilizados para a terapia de enfermidades causadas por *S. aureus*, entre outros patógenos. Segundo Magiorakos *et al.* (2012), os peritos internacionais pertencentes do *European Center for Disease Control* (ECDC) e do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos EUA, caracterizam como bactéria multirresistente aquela capaz de se apresentar resistente a três ou mais classes ou subclasses de agentes antimicrobianos a partir de testes. Outra definição proposta pelos mesmos autores é a de que são aquelas resistentes a um agente antimicrobiano chave, que confere uma co-resistência a múltiplas classes, tais como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

Uma possível justificativa para a elevada frequência de cepas multirresistentes observadas neste estudo pode estar relacionada à utilização de suplementos alimentares contendo antibióticos (Sulfadimidina, Trimetoprima e Clortetraciclina), que se encontram misturados de forma homogênea à ração dada a estes animais e que são administrados desde a fase de creche até a de terminação do suíno (NOBRE *et al.*, 2017).

Em um estudo realizado em 2012 por Masson, também foi encontrada a maior predominância de *S. aureus* multirresistentes onde os princípios ativos de menor frequência de resistência foram penicilina, tetraciclina, clindamicina, eritromicina e ciprofloxacina. A resistência a penicilina é bem variável em alguns países, contudo frequências elevadas já foram descritas em estudos na Dinamarca (84%) e Bélgica (60%) (AARESTRUP *et al.*, 2008).

A literatura indica uma variação no perfil de resistência a antibióticos e a disseminação destas cepas multirresistentes demonstra a necessidade de mudanças em protocolos terapêuticos tanto na medicina humana como veterinária (FEITOSA *et al.*, 2017).

Estudos mostram que há evidências de que a resistência aos antimicrobianos vem aumentando em *Staphylococcus* spp. isolados de animais destinados à alimentação humana (COSTA, 2013). O surgimento de resistência a múltiplas drogas em *S. aureus* vem sendo responsável por grandes prejuízos à pecuária, muitas vezes devido ao insucesso nos tratamentos utilizados (MORITZ; MORITZ, 2016). Além disso, o risco de veiculação de bactérias



resistentes a diferentes antimicrobianos, através de produtos de origem animal, torna-se risco à saúde pública (von BAUM; MARRE, 2005).

TABELA 8: Perfil genotípico por genes associados a resistência a diferentes antibióticos em 18 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos da cadeia produtiva de carne suína.

Nº de genes	Perfil genotípico	n	Origem
3	: <i>femB-blaZ-mecA</i>	4	Pocilga, carcaça (A)
2	: <i>femB-blaZ</i>	1	Carcaça (A)
2	: <i>blaZ-mecA</i>	5	Baia, pocilga, carcaça (A)
1	: <i>blaZ</i>	5	Pocilga
0	: nenhum	3	Baia, pocilga

FONTE: Dados da pesquisa. (A) Carcaça após a sangria.

Ao serem avaliados o perfil genético de resistência a antimicrobianos por *S. aureus* (Tabela 8), 83,3% dos isolados de *S. aureus* apresentaram resultados positivos para *blaZ* (PEN), 22,2% para *femB* (OXA); para gene *mecA* (OXA) 50% dos isolados; não foram observados resultados positivos para *tetK* (TET), *vanA* (VAN) e *mecC* (OXA).

O resultado para o perfil genético para resistência aos antimicrobianos selecionados entre os isolados de *S. aureus* obtido foi: quatro isolados apresentaram apenas três dos genes pesquisados *blaZ*, *femB* e *mecA* (pocilga, carcaça (A)); um isolado confirmou a sequência de genes *femB-blaZ* (carcaça (A)); em 5 isolados apresentaram somente o gene *blaZ* (pocilga); cinco isolados apresentaram simultaneamente os genes *mecA-blaZ* (baia, pocilga, carcaça (A)); e três não apresentaram nenhum dos genes pesquisados (Baia, pocilga) (Tabela 8).

A multirresistência é um fenômeno extremamente relevante, pois compromete a eficácia dos fármacos utilizados para protocolos terapêuticos usados em possíveis enfermidades causadas por *S. aureus*.

Três isolados apresentaram-se, fenotipicamente, resistentes a oxacilina, apresentando o gene *mecA* em quatro isolados, que expressa a resistência à meticilina. LEE (2003) encontrou comportamento semelhante em dois *S. aureus* isolados de suínos também *mecA* negativos. Este fato pode ser explicado, já que pois, *S. aureus* produzem outras betalactamases fenotipicamente indistinguíveis (TURUTOGLU et al., 2006). A metodologia empregada, também pode interferir

no diagnóstico e identificação de estirpes resistentes a meticilina (KHANNA et al., 2008). A ausência do gene *mecA* também foi descrita por BAGCIGIL (2007) que avaliou 400 amostras de *S. aureus* isolados de animais domésticos incluindo 100 suínos. Na literatura, podemos encontrar diferentes prevalências de MRSA pelo mundo. Na Coreia a prevalência de MRSA em suínos variou de 0 a 7,8% e de 0 a 50% para as granjas (LIM et al., 2011). No Japão a prevalência encontrada foi de 0,9% (BABA et al., 2010) e na Malásia de 1,38% (NEELA et al., 2009). Dentre os países asiáticos a China foi o país com maior índice de MRSA (11,8%) (CUI et al., 2009). No continente europeu e na América do norte as prevalências são bem mais altas, sendo de 49% na Alemanha (TENHAGEN et al., 2009), 39% na Holanda (NEELING et al., 2007), 21% na Espanha (GÓMEZ-SANZ et al., 2010), 36% nos Estados Unidos (SMITH et al., 2009) e 26% no Canadá (KHANNA et al., 2008).

## 6 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a presença de SCP e *S. aureus* nas etapas iniciais de produção e carne suína, sendo que os locais com maiores prevalência foram pocilga de espera e a baia na granja, mostrando a possibilidade de que as culturas possam ter se originado nas propriedades, podendo se disseminar para a linha do abate, o que reforça a importância de controles de qualidade eficientes dentro da indústria de alimentos, a fim de reduzir a contagem de *Staphylococcus aureus* para níveis aceitáveis.

Foi verificada a presença de cepas multirresistentes, motivo este de preocupação, devido à possibilidade de disseminação no rebanho e veiculação destas cepas ao longo do processo produtivo. A multirresistência deste agente, encontrada neste estudo na cadeia produtiva, é outro fator que traz grande preocupação, pois estas cepas podem ultrapassar os processos de higienização dentro da indústria no caso de falhas e contaminar a carne.

Em relação aos genes relacionados a resistência a diferentes antimicrobianos, a maioria dos isolados apresentaram resultados positivos para penicilina, para os genes da oxacilina o percentual de genes apresentado foi representativo, indicando a presença de cepas MRSA. Os resultados fenotípicos e genotípicos demonstram a existência de heterogeneidade e variedade genética envolvida na expressão fenotípica da resistência a meticilina e demais antimicrobianos através da heterorresistência.

O estudo indicou a presença de MRSA, o que pode ser um motivo de preocupação em saúde pública, principalmente do ponto de vista ocupacional, uma vez que as cepas apresentaram elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos.

A associação de testes fenotípicos e genotípicos para caracterizar o perfil de resistência de *S. aureus* presentes na produção de carne suína é importante para detectar qual perfil de resistência possui o agente pesquisado.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALRAHMAN, L. S.; WELLS, H.; FAKHR, M. K. *Staphylococcus aureus* is more prevalent in retail beef livers than in pork and other beef cuts. **Pathogens**, v.4, p. 182-198, 2015.
- ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2018**. Disponível em: [http://abpabr.com.br/storage/files/3678c\\_final\\_abpa\\_relatorio\\_anual\\_2016\\_portugues\\_web\\_reduzido.pdf](http://abpabr.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf). Acesso em: 02 de março de 2019.
- ABIEC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. Perfil da Pecuária no Brasil: **Relatório Anual 2018**. Disponível em: <http://www.girodobo.com.br/wp-content/uploads/2018/07/Perfil-daPecu%C3%A1ria-no-Brasil-ABIEC.pdf>. Acesso em: 31 de julho de 2018.
- ACOSTA, A. C.; COSTA, M. M.; JUNIOR J. W. P.; MOTA, R. A. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v.11, n.4, p.252-269, 2017.
- AKLILU, E.; ZUNITA, Z.; HASSAN, L.; CHEN, C. H. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among veterinary students and personal at a veterinary hospital in **Malaysia**. **Veterinary Microbiology** v.164. p.352-358, 2013.
- ALMEIDA, M. S. C.; MENDONÇA, R. L.; FREITAS, M. Z. C.; VANDESMET, L. C. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 1, n. 01, 2016.
- ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) na América Latina **Braz. J. Infect. Dis.** v.14 s.2, 2010.
- ALVAREZ, P. A.; MIMICA, M. J. Síndrome do choque tóxico. **Arq. Med. Hosp. Fac. Cienc. Med. Santa Casa**, São Paulo, v. 57, n. 2, p. 81–84, 2012.
- AMATO NETO, V. et al. **Antibióticos na prática médica**, 5 ed., São Paulo: Roca, 2000.
- AMINOV, R. I.; GARRAGUES-JEANJEAN, N.; MACKIE, R. I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primer for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. **Appl. Environ Microbiol.** v. 67, n.1, p. 22-32, 2001.

- ANDRADE, E. C.; LEITE, I. C. G.; RODRIGUES, V. O.; CESCO, M. G. Parasitoses intestinais: Uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêutico. **Revista Atenção Primária a Saúde**, Juiz de Fora, v. 13, p. 231-240, 2010.
- ARANTES, T.; PAIXÃO, G. O. D.; SILVA, M. D.; CASTRO, C. S. de Amorim. Avaliação da colonização e perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* em amostras de secreção nasal de profissionais de enfermagem. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 1, p. 30–34, 2013.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Uso racional de antimicrobianos e a resistência microbiana. Brasília: Anvisa; 2017. [s.p.]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/atm\\_racional/modulo\\_1/res\\_principais2.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo_1/res_principais2.htm), acesso em 12 de agosto de 2018.
- ANVISA Resolução RDC nº 12, de 12 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – 2001.
- ATIQUE, T. S. C.; LIMA, T. A. M. de; SOUZA, V. A. de; PACHECO, P. F. C.; FURINI, A. A. C. Sensibilidade à meticilina / oxacilina de *Staphylococcus aureus* isolados da mucosa nasal de alunos do Centro Universitário de Rio Preto. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 3, p. 347–352, 2012.
- BABA, T.; KUWAHARA-ARAI, K.; UCHIYAMA, I.; TAKEUCHI F.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Complete genome sequence of *Macrococcus caseolyticus* strain JCSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.191, n.4, p.1180–90, 2009.
- BAE, W.; KAYA, K. N.; HANCOCK, D. D.; KAYA, N. K.; CALL, D. R.; PARK, Y. H.; BESSER, T. E. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington State. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 169–174, 2005.
- BAKER, S. R.; MASSON, G. C. I. H.; OLIVEIRA, L. G. et al. A pilot study of the prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in swine populations of Brazil and United States. Proceedings in: **American Association of Swine Veterinarians**, 2008.
- BANIA, J.; DABROWSKA, A.; KORZEKWA, K.; ZARCZYNSKA, A.; BYSTRON, J.; CHRZANOWSKA, J.; MOLEND, J.. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. **Lett. Appl. Microbiol.** n.42, p.315-320, 2006.

- BARBER, M. Methicillin-resistant staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**. v.14, p.385-393, 1961.
- BARRETO, N. S. E.; DAMACENA, S. S.; CARDOSO, L. G.; MARQUES, V. F.; SILVA, I. P. Condições higiênicas sanitárias e grau de frescor do pescado comercializado no mercado de peixe em cachoeira, Bahia. **Revista brasileira de higiene e sanidade animal: RBHSA**, v. 11, n. 1, p. 60-74, 2017.
- BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. J. of Appl. Bacteriol. **Symposium Supplement**, 1S-8S, 1990.
- BARCELLOS D. E. S. N.; BOROWSKI, S. M.; GHELLER, N. B. Relação entre ambiente, manejo e doenças respiratórias em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 36, n. 1, p. 87-93, 2008.
- BENEKE, B. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a fresh meat pork production chain. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.74, n.1, p. 126 – 129, 2011.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014.
- BLAIOTTA, G.; FUSCO, V.; PEPE, D. E. O.; COPPOLA, S. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial kat (catalase) gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 192-201, Jan. 2010.
- BNDES, Banco Nacional do desenvolvimento. Relatório 2018. Disponível em: <https://www.bndes.gov.br/wps/portal/site/home/conhecimento/noticias/noticia/suinocultura-infografico> 2018 acesso: 05 de janeiro de 2019.
- BOARI, C. A.; PICCOLI-VALLE, R. H.; NASCIMENTO, A. R.; ALCÂNTARA, E. M. C. Ocorrência de cepas de estafilococos coagulase positiva formadoras de colônias atípicas em ágar Baird-Parker em queijos maturados. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 347- 354, 2002.
- BOND, R., LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*. Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **J. Small Anim. Pract.**, v.53, p.147-154, 2012.

- BOER, E.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M.; HUIJSDENS, B. W. X. W.; NEELING, A. J.; BOSCH, T.; VAN OOSTEROM, R. A. A.; HEUVELINK, A. E. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. **International Journal of Microbiology**, v.134, p. 52-56, 2009.
- BOMBARDELLI, R.A.; SYPPERRECK, M.A.; SANCHES, E.A. Situação atual e perspectivas para o consumo, processamento e agregação de valor ao pescado. **Arq. ciên. vet. zool.** UNIPAR, v. 8, n. 2, p. 181-195, 2005.
- BRAMLEY, A. J., DODD, F. H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control – progress and prospects. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 51, p. 481-512, 1984.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva, SIH/SUS, DATASUS, Brasília, 1998.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2 de janeiro de 2001). Resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 12: regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos 2001 (pdf). Consultado em 20 de Setembro de 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Brasília, DF, 2001. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC\\_12\\_2001\\_COMP.pdf/b3cb6241-6d1b-49fc-8a88-b0781a147980](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_12_2001_COMP.pdf/b3cb6241-6d1b-49fc-8a88-b0781a147980)>. Acesso em: 9 de julho de 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 46. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 3 jun. 2018. BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/ApresentaodadosgeraisDTA2015.pdf>. Acesso em 30 de outubro de 2018.
- BRESOLIN, B. M. Z.; DALL’STELLA, J. K.; SILVA, S. E. F. Pesquisa sobre *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mãos de manipuladores de alimentos em Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia**, v. 27, n. 59, p.27-32, 2005.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos de amostras para



- Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 53, n. 5, p. 531-537, 2001.
- BUTAYE, P.; ARGUDÍN, M. A.; SMITH, T. C. Livestock-Associated MRSA and Its current Evolution. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 3, p. 19-31, 2016.
- CADDICK, J. M.; HILTON, A. C.; ARMSTRONG, R. A.; LAMBERT, P. A.; WORTHINGTON, T.; ELLIOT, T. S. J. Description and critical appraisal of principal components analysis (PCA) methodology applied to pulse-field gel electrophoresis profiles of 49 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.65, p. 87-95, 2006.
- CAPITA, R.; CALLEJA, C. A.; FERNANDEZ, M. C. G.; MORENO, B. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat in Spain. **Poultry Science**, Champaign, n. 81, p. 414-421, 2002.
- CARDOSO, M. O que representam os suínos na transmissão de zoonoses para humanos? **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, supl. 1, p. s81-s89, 2009.
- CARVALHO, P. L. C.; VIANA, E. F. Suinocultura SISCAL e SISCON: análise e comparação dos custos de produção. Custos e @gronegócio on line - v. 7, n. 3, 2011.
- CARVALHO, S. A.; CARMO, L. S.; ABREU, E. F.; DIAS, R. S.; APOLÔNIO, A. C. M.; SANTOS, S. G.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R. TSST-1, enterotoxin and bacteriocin-like substance production by *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.65, n.5, p1537-1544, 2013.
- CERQUEIRA, E. S.; ALMEIDA, R. C. C. *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. São Paulo, 2013; 72(4):268-81.
- CHAPIN, A.; RULE, A.; GIBSON, K.; BUCKLEY, T.; SCHWAB, K. Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 2, p.137-142, 2005.
- COELHO, S. M. O.; MORAES, R. A. M.; SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A. P.; GOMES, L. P.; SOUZA, M. S. S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus*



*intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.1, p.195-200, 2007.

COSTA, J. N. P.; SANTOS, V. V. M.; SILVA, G. R.; MOURA, F. M. L.; GURGEL, C. A. B.; MOURA, A. P. B. L. Condições higiênico-sanitárias e físico estruturais da área de manipulação de carne *in natura* em minimercados de Recife (PE), Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.80, n.3, p. 352-358, 2013.

COSTA, G. M. et al. Resistência a antimicrobianos em *S. aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.

COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**. Macapá, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

CRUZ, E. D. A. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina em trabalhadores de um hospital universitário: colonização e crenças em saúde. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2008. 187 p. Disponível em: file:///D:/User/Downloads/ElaineDrehmerdeAlmeidaCruz.pdf. Acesso em 13 de setembro de 2018.

CUNHA, M. L. R. S.; LOPES, C. A. M.; RUGOLO, L. M. S. S.; CHALITA, L. V. A. S. Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. **Jornal Pediátrico** - RJ, v.78, n.4, p. 279-88, 2002.

CUNHA, M. L. R. S.; CALSOLARI, R. A. O. Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiology Insights**, v. 1, p. 13-24, 2008.

DALLA COSTA, O. A.; AMARALL, A. L.; LUDKEL, J. V.; COLDEBELLA, E.; FIGUEIREDO, A. P. Desempenho, características de carcaça, qualidade da carne e condição sanitária de suínos criados nas fases de crescimento e terminação nos sistemas confinado convencional e de cama sobreposta rústicas de carcaça, qualidade da carne e condição sanitária de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2307-2313, 2008.

DE BOER, E. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. **International Journal of Microbiology**, v.134, p.52-56, 2009.

DE LENCASTRE, H. S. A.; FIGUEIREDO, A. S.; URBAN, C.; TOMASZ, A. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for

detection in clinical isolates of *S. aureus*. **Antimicrob Agents Chemother** v.35, p.632-639, 1991.

DIAS, N. L.; SILVA, D. C.B; OLIVEIRA, D. C. B.; FONSECA JUNIOR, A. A.; SALES, M. L.; SILVA, N. Detecção de genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência a Metilicina em leite. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.6, p. 1547-1552, 2011.

DIAS, R. S. Surtos de intoxicação alimentar por linhagens enterotogênicas de *Staphylococcus* ocorridos em diferentes municípios mineiros. **Periódico Científico do Núcleo de Biociências** – Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Belo Horizonte, MG. v.2, n4, 2012.

DÓRIA, J. S. Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de derivados de 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos e de derivados de 5(6)-benzofuroxânicos frente a cepas padrão e multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 137, 2007.

DROLET, R.; DEE, S. A. Diseases of the urinary system. In: STRAW, E. B.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. (ed.) Diseases of Swine. 8 ed Iowa: Iowa State University, cap. 63, p. 959–976, 1999.

DUARTE, F. C.; DANELLI, T.; RIBEIRO, M. A. G.; PERUGINI, L. F.; VESPERO, E. C.; CARRARA-MARRONI, F. E; PELISSON, M.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATA, S. F.; PERUGINI, M. R. E. Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus*: Uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. **Revista de Epidemiologia e Infecção Hospitalar**. v. 8, n. 3, 2018.

EDUCAÇÃO, Portal -. Sistemas de Criação de Suínos. 2013. Elaborado por colunista portal - educação. Disponível em: < <https://www.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/conteudo/sistemas/36992#ixzz313ON5Y5M>>. Acesso em 07 set 2018.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing nomenclature. Paris, 2016. Disponível em: < <http://www.bacterio.net>>. Acesso em: 15 de setembro de 2018.

FARIA, S. T.; CRISTINA, A.; PIEKARSKI, R.; CRISTINA, M.; TOGNIM, B.; BORELLI, S. D.; BEDENDO, J. isolados de estudantes de enfermagem. **Acta Paul Enferm**, v. 24, n. 2, p. 213–218, 2011.

- FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, M. R.; TORRES, E. A. T.; SILVA, J. F. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Revista Desafios**, v.04, n. 04, 2017.
- FEßLER, A. T.; KALDEC, K.; HASSEL, M.; HAUSCHILD, T.; EIDAM, C.; EHRLICH, R.; MONEKE, S.; SCHWARZ, S. Characterization of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in germany. **Applied and environmental microbiology**. v.77, n.20, p.7151, 2011.
- FERNANDES FILHO, A. C.; SANTANA, C. O. S.; GATTAMORTA, M. A. Utilização de biodigestores para geração de energia elétrica a partir de dejetos de suínos no brasil. **Journal of Engineering, Architecture e Technology Innovation**. INOVAE, São Paulo, v.6, p.67-84, 2018.
- FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. beta-Lactam Resistance Mechanisms: GramPositive Bacteria and Mycobacterium tuberculosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**. v. 6, n. 5, 2016.
- FLORES, A. M. C.; MELO, C. B.; Principais bactérias causadora de doenças de origem alimentar. **Arq. Bras. Med., Vet.**, v. 37, n.1, p.65-72, 2015.
- FLUIT, A.; VISSER, M.; SCHMITZ, F. Molecular detection of Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(4), 837-862. 2001.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 607p., 2013.
- FRANCO, B. D. G. M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- FRASER, D.; DUNCAN, I. J. H.; EDWARDS, S. A.; GRANDIN, T.; GREGORY, N. G.; GUYONNET, V.; HEMSWORTH, P. H.; HUERTAS, S. M.; HUZZEY, J. M.; MELLOR, D. J.; MENCH, J. A.; SPINKA, M.; WHAY, H. R. General Principles for the welfare of animals in production systems: The underlying science and its application. **The Veterinary Journal**, Londres, v.198, n. 1, p. 1927,
- FREITAS, A. B.; PEREIRA, J. Q.; TEIXEIRA, D. R.; MOURA, M. A.; *Staphylococcus aureus* Resistentes em Animais de Companhia. **Revista Eletrônicas Novo Enfoque**, v.16, n. 16, p. 95-101, 2013.
- FUDA, C.; HESEK, D.; LEE, M.; HEILMAYER, W.; NOVAK, R.; VAKULENKO, S. B. Mechanistic basis for the action of new cephalosporin antibiotics effective

against methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. The **Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.15, p.10035-10041, 2013.

GANTER, M.; KIPPER, S.; & Hensel, A. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage of live anaesthetized pigs. **Proceeding. International Pig Veterinary Society**, v.11, p.109, 1990.

GARCIA, P. N. Adesão dos profissionais de saúde às precauções de contato em unidade de terapia intensiva. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Enfermagem) – Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2011. Disponível em: [http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/96447/garcia\\_pn\\_me\\_botfm.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/96447/garcia_pn_me_botfm.pdf?sequence=1&isAllowed=y) acesso em 10 de setembro de 2018.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquicultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 29-45, 2014.

GELATTI, L. C.; BECKER, A. P.; BONAMIGO, R. R.; AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes a Metilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.84, n.5, p. 501-506, 2009.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, p. 629, 2001.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B.; VANHEMS, P.; FOURNET, J. C.; LINA, G.; BES, M.; VANDENESCH, F.; PIEMONT, Y.; BROUSSE, N.; FLORET, D.; ETTIENE, J. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotizing pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet**, v.359, p.753-759, 2002.

GOES, J. A. W. Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida. **Revista de Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.82, p.20-22, 2001.

GOLDMANN, D. A. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* and Group-A streptococci. In: Bennett, J.V., Brachman, P.S., Hospital infections, Brown Little, Boston, p.767-87, 1992. GOMES, M. J. P. Gênero *Staphylococcus* spp. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAAnero%20Staphylococcus%20spp%204-2013-1.pdf>. Acesso em: 07 de abril de 2018.

- GÓMEZ-SANZ, E. et al. Detection molecular characterizatón, and clonal diversity of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. **Foodborne Pathogens and Disease, Larchmont**, v. 7, p. 1269 -1277, 2010.
- GUIMARÃES, D.; AMARAL, G.; MAIA, G.; MINORU, M. L.; CUSTODIO, I. S. Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no brasil e 76 no mundo e o apoio do BNDES. BNDES Setorial 45. **Agribusiness**. v.45, p. 85-136, 2017.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química nova**, v.33, n.3, p. 667-679, 2010.
- HASMAN, H.; MOODLEY, A.; GUARDABASSI, L.; STEGGER, M.; SKOV, R.; AARESTRUP, F. M. Spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. **Veterinary Microbiology**, v.141, n.3, p.326-331, 2010.
- HARTMANN, W. Curso de Pós-Graduação em Inspeção de Produtos de Origem Animal – Módulo Inspeção Industrial e Sanitária do Leite. **Sociedade Paranaense de Medicina Veterinaria/Equalis**. p. 135, 2005.
- HENNEKINNE, J.-A.; BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**. v.36, n.4, p.815-836, 2012.
- HIRAMATSU, K., HANAKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGURI, T., TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p. 135-136, 1997.
- HURLIMANN-DALEL, R.L.; RYFFEL, C.; KAYSER, F. H.; BERGER-BACHI, B. Survey of the Methicillin Resistance-Associated Genes *mecA*, *mecRI-mecI*, and *femA-femB* in Clinical 76 Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 12, p. 2617-2621, 1992.
- ITO, T., KATAYAMA, Y., ASADA, K., MORI, N., TSUTSUMIMOTO, K., TIENSASITORN, C., HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome i.n methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, p. 323- 1336, 2001.

- JÚNIOR, B. R. C. L.; OLIVEIRA, P. M.; SILVA, F. J. M.; MARTINS, M. L. Qualidade Microbiológica de Origem Animal Comercializados na Região de Minas Gerais, Vértices, Campos dos Goytacazes, RJ. v.15, n.2, p. 49-59, 2013.
- KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, E. D. *Staphylococcus aureus* e Staphylococcal doença transmitida por alimentos: um desafio contínuo na saúde pública. **Biomedicina Res.**, 2014.
- KHANNA, T.; et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 128, p.298-303, 2008.
- KATAYAMA, Y.; ROBINSON, D. A.; ENRIGHT, M. C.; CHAMBERS, H. Genetic background affects stability of *mecA* in *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical Microbiology**, Washington, v.43, n. 5, p. 2380-2383, 2005.
- KÉROUANTON, A.; HENNEKINNE, J. A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M. L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.369-375, 2007.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins, p.1395, 1997.
- KORB, A.; BRAMBILLA, D. K.; TEIXEIRA, D. C.; RODRIGUES, R. M. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, Florianópolis, v. 4, n. 1, dez. 2011.
- KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance; **Antimicrob Agents Chemother**, v.44, p.3249 – 3256, 2000.
- KULLMAN, F. et al. A comparison of methods for DNA extraction from paraffinembedded tissue for microsatellite instability analysis by PCR. **Acta Biotech**, v. 18, n. 1, p. 77-83, 1998.
- KÜREKCI, C. Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 99, n. 4, p. 2675–2679, 2016.

- LAMARO-CARDOSO, J.; LENCASTRE, H.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; OLIVEIRA, L. S. C.; OLIVEIRA, R. M.; NOUER, S. S.; AIRES-DE-SOUSA, M.; MILHEIRIC, C.; ANDRADE, A. L. S. Molecular epidemiology and risk factors for nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in infants attending day-care centers in Brazil. **J Clin Microbiol.** v.47, n.12, p.3991-3997, 2009.
- LANGE, T. N. Ação educativa da vigilância sanitária, como instrumentos de aprimoramento da qualidade dos alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 22, n. 165, p. 40-45, 2008.
- LEE, J. H. Methicilin (Oxacilin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major foof animals and their potencial transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n11, p. 6489 – 6494, 2003.
- LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M.; Aminoglycosides: Activity and Resistance, **Antimicrob Agents Chemother.** v.43, p.727– 737, 1999.
- LIMA, E., S., C.; PINTO, P. S. A.; SANTOS, J. L.; VANETTI, M. C. D. Isolamento de *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio as sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.24, n.4, 2004.
- LINHARES, L. L.; YANG, M.; SREEVATSAN, S.; MUNOZ-ZANZI, C. A.; TORREMORELL, M.; DAVIES, P. R. The effect of anatomic site and age on detection of *Staphylococcus aureus* in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n.1, p.55–60, 2015.
- LIU, X.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L. Beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**. v. 121, p.197–214, 2007.
- LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.** v.111, p.1265-1273, 2003.
- LUCIO, E. C.; OLIVEIRA JUNIOR, M. B.; GOUVEIA, G., V.; COSTA, M. M.; BRANDESPIM, D. F.; MOTA, R., A.; JUNIOR PINHEIRO, J., W. Pesquisa dos genes *mecA* e *blaZ* em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina na microrregião de Garanhuns. XII jornada de ensino, pesquisa e extensão – JEPEX – UFRPE, Recife, 09 a 13 de dezembro, 2013.



- LUDTKE, C. B., DALLA COSTA, O. A. Abate humanitário de suínos. Rio de Janeiro: **WSPA**, 2012. Disponível em: Acesso em: 20 ago. 2018.
- MA, X. X.; GALIANA, A.; PEDREIRA, W.; MOWSZOWICZ, M.; CHRISTOPHERSEN, I.; MACHIAVELLO, S.; LOPE, L.; BENADERET, S.; BUELA, F.; VICENTINO, W.; ALBINI, M.; BERTAUX, O.; CONSTENLA, I.; BAGNULO, H.; LLOSA, L.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, **Uruguay. Emerging Infectious Diseases**, v.11, p.973-976, 2005.
- MACHADO, S. T.; SANTOS, R. C.; CALDARA, F. R.; GONÇALVES, M. C.; NÄÄS, I. A. Análise multivariada integrada para avaliação dos efeitos do manejo pré-abate na qualidade da carne suína. **Engenharia Agrícola, Jaboticabal**, v. 34, n. 3, p. 435-444, mai./jun. 2014.
- MADEIRA, L. A.; SARTORI, J. R.; SALDANHA, E. S. P. B.; PIZZOLANTE, C. C.; SILVA, M. D. P.; MENDES, A. A.; TAKAHASHI, S. E.; SOLARTE, W. V. N. Morfologia das fibras musculares esqueléticas de frangos de corte de diferentes linhagens criados em sistemas de confinamento e semiconfinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.6, p.2322-2332, 2006.
- MADIGAN, M. T. et al. Microbiologia de Brock. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: ArtMed. p. 1160, 2010.
- MAPA, PORTARIA Nº 711, DE 1º DE NOVEMBRO DE 1995. (alterado pela portaria nº 1.304, de 7 de agosto de 2018) disponível em:< [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtosanimal/empresario/arquivos/copy\\_of\\_Portaria7111995alteradaportarian13042018.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtosanimal/empresario/arquivos/copy_of_Portaria7111995alteradaportarian13042018.pdf). acesso em: 10 de outubro de 2018.
- MARTINS, A., CUNHA, M.L.R.S. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative Staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiology and Immunology**, v. 51, p. 787-795, 2007.
- MARTY, V.; ADIRAJU, V.S.; BRUNNER, D. P.; WILKINSON, B. J. Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** 1987; 31: 1727-1733. DOI: <http://dx.doi.org/0066-4804/87/111727>
- MASSON, G. C. I. H.; FERREIRA, G.S.; CARVALHO, L.F.O.S. Perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de granjas



e frigoríficos de suínos. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n. 1, p. 1-14, 2012.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **J. Clin. Microbiol.** v.38, n.3, p.1032–1035, 2000.

MENDONÇA, E. C. L.; MARQUES, V. F.; MELO, D. A.; ALENCAR, T. A.; COELHO, I. S.; COELHO, S. M.; SOUZA, M. M. S. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesquisa Vet. Bras.** v.32, n.9, p.859-864, 2012.

MENIN, A.; RECK, C.; JEAN CARLOS CAPELLI, J. C.; SANDRA MARIA FERRAZ, S. M.; ELIANA KNACKFUSS VAZ, E. K. Diagnóstico de infecção urinária em fêmeas suínas produtivas em granjas comerciais no sul do Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n.1, p. 199 -206, 2008.

MERUSSI, G. D.; MAFFEI, D. F.; CATANOZI, M. P. L. M. Surtos de gastroenterite relacionados ao consume de laticínios no Estado de São Paulo no período de 2000 a 2010. **Alim. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 639-645, 2012.

MIMICA, M. J.; BEREZIN, E. N. *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente. *Arq. Med. Hosp. Fac. Ciências Medicas Santa Casa de São Paulo*, v.51, n.2, p.52-56, 2006.

MISTERIO DA SAUDE, Sinan/SVS/Ministério da Saúde <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>. Acesso em 14 de julho de 2018.

MIYOSHI, N.; ISOGAI, E.; HIRAMATSU, K.; SASAKI, T. Activity of tick antimicrobial peptide from *Ixodes persulcatus* (persulcatusin) against cell 80 membranes of drug-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Antibiotics**, v.70, n.2, p.142-146, 2017.

MORITZ, F.; MORITZ, C. M. F. Resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. associados à mastite bovina. **Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.**, v. 3, n. 2, p. 132-136, 2016.

MURRAY, B. E.; ARIAS, C. A.; NANNINI, E. C. Glycopeptides (Vancomycin and Teicoplanin), Streptogramins (Quinupristin-Dalfopristin), Lipopeptides (Daptomycin), and Lipoglycopeptides (Telavancin). In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / John E. Bennett,

- Raphael Dolin, Martin J. Blaser. – **Eighth edition. Philadelphia: Elsevier:** p.376- 400, 2015.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHA, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica.** 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- NASCIMENTO, C. B. Surtos de toxinfecção alimentar notificados e investigados no município de Porto Alegre no período de 2003 a 2011. 2013. Monografia (Especialista em Produção, Higiene e Tecnologia de Produtos de Origem Animal) - **Faculdade de Veterinária**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- NASCIMENTO, J. P. M.; RAMOS, R. L. B. STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE À METICILINA EM JALECOS DE ESTUDANTES DE ENFERMAGEM. **Revista Saúde.Com**, v. 12, n. 1, p. 463–469, 2016.
- NEELA, V. et al. Prevalence of ST9 methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* among pigs and handlers in Malaysia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, p. 4138-4140, 2009.
- NEELING, A. J. et al. High prevalence of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 122, p. 366-372, 2007.
- NORMANNO, G.; DAMBROSIO, A.; LORUSSO, V. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in slaughtered pigs and abattoir workers in Italy. **Food Microbiology**, Foggia, v. 51, p. 51-56, 2015.
- OLIVEIRA, L. G. et al. Bem-estar animal aplicado nas criações de suínos e suas implicações na saúde dos rebanhos. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, ano XI, n. 21, jul. 2013. Disponível em: [http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/YhtnLpAFRYLxnCV\\_2013-8-14-15-23-47.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/YhtnLpAFRYLxnCV_2013-8-14-15-23-47.pdf). Acesso em: 05 ago 2018.
- OLSEN, J. E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F. M. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 450- 460, 2006.
- O'SULLIVAN, T.; ROBERT, F.; TIM, B.; DAVID, P.; BEVERLY, M.; SUSY, C.; ĐURĐA, S.; CATHERINE, D. Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.75 p.106–111, 2011.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da carne**. 2. ed. Goiânia, 623p., 2001.

PALERMO-NETO, J. O problema d uso inadequado de antibióticos na produção de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.35, supl. 35, p. S1-S8, 2007.

PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos em suinocultura e desenvolvimento de resistência bacteriana: uma análise de risco Disponível em:< <http://www.porkworld.com.br/artigos/post/uso-de-antimicrobianos-em-suinocultura-e-desenvolvimento-de-resistencia-bacteriana-uma-analise-de-risco>>Acesso em: 02 de setembro de 2018.

PÉREZ-ROTH, E., CLAVERIE-MARTÍN, F., VILLAR, J.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. **Journal Clin Microbiol**. v. 39, n.11, p.4037–4041, 2001.

PIETTE, A.; VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 1-2, p. 45-54, 2009.

PRADO, R. R.; FREITAS, E. A.; VALADARES JÚNIOR, E. C.; COSTA, P. C.; SIQUEIRA, M. C.; ROSSI, D. A. *Staphylococcus* spp.: importantes riscos à saúde pública. **PubVet Maringá**, v. 9, n. 8, p. 363-368, 2015.

PLATA, K., ROSATO, A. E., WEGRZYN, G. *Staphylococcus aureus* as na infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 4, p. 597-612, 2009.

PREVOST, G., COUPPIE, P., PREVOST, P., GAYET, S., PETIAU, P., CRIBIER, B., MONTEIL, H. & PIEMONT, Y. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. **J. Med. Microbiol**. 42, 237–245, 1995.

RÉ, L. C.; FREIBERGER, J. A.; KNOB, A. Incidência da bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e em mãos de manipuladores de alimentos em uma creche no município de Guarapuava (PR). **Ambiência Guarapuava** (PR) v.9 n2. p. 381 - 393. 2013.

RINCÓN, S.; PANESSO, D.; DÍAZ, L. et al. Resistencia a antibióticos de última línea em cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. **Biomédica, Bogotá**, v. 34, n. 1, p. 191-209, 2014.

- RIVAS, T.; VIZCAÍNO, J. A.; HERRERA, F. J. Microbial contamination of carcasses and equipment from an Iberian pig slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 12, p. 1670-1675, 2000.
- ROBERSON, J. R. et al. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **J. Dairy Sci. Savoy**, v. 77, p. 3354-3364, 1994.
- ROBERSON, J. R. et al. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. **J. Dairy Sci.**, v. 81 (3), p. 687-693, 1998.
- ROÇA R. O. Composição Química Da Carne. F.C.A. - UNESP - Campus de Botucatu, 2008. Disponível em: Acesso em: <http://www.fca.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/Gestaoetecnologia/Teses/Roca102.pdf>. Acesso em 17 de agosto de 2018.
- RODRÍGUEZ-NORIEGA, E., SEAS, C., GUZMÁN-BLANCO, M., MEJÍA, C., ALVAREZ, C., BAVESTRELLO, L., ZURITA, J., et al. Evolution of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 560–6, 2010.
- SADER, H. S. Resistência bacteriana a antimicrobianos. In: In: Focaccia R, editor. **Tratado de infectologia**. 5ª. ed. rev. atual. São Paulo: Atheneu; p. 107-127, 2015.
- SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em alimentos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, 2010.
- SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. Texto Contexto Enferm., 2004; 13(n.esp):64-70. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/tce/v13nspe/v13nspea07.pdf>. acesso em 03 de setembro de 2018.
- SANTOS, A L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Bras Patol Med Lab**, 2007; 43(6):413-423. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v43n6/v43n6a05.pdf>. Acesso em 03 de setembro de 2018.
- SANTOS, A. R. Rastreabilidade “do laboratório à mesa”: um estudo da cadeia produtiva da indústria de carne suína na empresa Doux. Dissertação (Mestrado em Administração) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.

- SANTOS, J. R.; MEZA, S. K. L.; MARTINI, K. C.; NUNES, R. V. A importância do controle da *Salmonella* na cadeia produtiva de frango de corte. **Scientia Agraria Paranaensis** – SAP, Mal. Cdo. Rondon, v. 12, n. 3, p.167-174, 2013.
- SCABIN, K. E. M.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; FRIAS, D. F. R. Qualidade microbiológica do leite in natura durante o processo de obtenção e após o 83 resfriamento. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, Medellín, v. 7, n. 1, 2012.
- SERGIO, D. M. B.; KOH, T. H.; HSU, L.; OGDEN, B. E.; A. L.; CHOW, P. K. H. Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 56, p.1107- 1109, 2007.
- SILVA FILHA, O. Experiências brasileiras na criação de suínos locais. **Revista Computadorizada de Producción Porcina**. v.15, n.1, 2008.
- SILVA, C. A.; AGOSTINI, P. S.; CALLEGARI, M. A.; SANTOS, R. K. S.; NOVAIS, A. K.; PIEROZAN, C. R.; PEREIRA JUNIOR, M.; ALVES, J. B.; GASÓ, J. G. Fatores que afetam o desempenho de suínos nas fases de crescimento e terminação. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.51, n.10, p.1780-1788, 2016.
- SILVA, F. R.; SANTANA, C. M.; MELO, W. F.; TALABERA, G. G.; SARMENTO, W. E.; SOBRINHO, W. S.; SÁ, J. A.; MACHADO, A. V. Conservação e controle de qualidade de queijos: **Revisão. Pubvet** v.11, n. 04, p.313-423, 2017.
- SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; LIMA FILHO, J. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciências Saúde Coletiva**, v.13, n.5, 2008.
- SMITH, T. C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain ST398 is present in mild western U.S. swine and swine workers. **Plos One, São Francisco**, v.4, n. 1, e4258.1-e4258.4, 2009.
- SOARES, L. C. et al. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 692- 696, ago. 2012.
- SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS D. **Doenças dos Suínos**. 2ª ed. Goiânia: Cânone Editorial, p. 959, 2012.

- SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F, C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n.1, p.27-36, 2005.
- SPESCHA, C.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Microbiological contamination of pig carcasses at different stages of slaughter in two European Union - approved 58 abattoirs. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.69, n.11, p. 2568 – 2575, 2006.
- STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; NETO, A. C. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. Isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, p.41-45, 2006.
- STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G.; WITE, W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol**, v.49, n.9, p.4089-4095, 2003.
- TAHNKIWALE, S. S; ROY, S.; JALGAONKAR, S. V. Methicillin resistance among isolates of *Staphylococcus aureus*: antibiotic sensitivity pattern & phage typing. **Archives of International Medicine**, v.56, n.7, p.330, 2002.
- TAPONEN, S.; SUPRÉ, K.; PIESENS, V.; COILLIE, E. V.; VLIEGHER, S.; KOORT, J. M. K. *Staphylococcus agnetis* sp. a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. **Int. J. Syst Evol Microbiology**, n.62, p.61- 65, 2012.
- TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**, Barcelona, v. 134, n. 1-2, p. 29-36, 2009.
- TAVARES, C. P.; PINTO, E. R. Tuberculose – Riscos associados ao seu tratamento; **Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto**, Janeiro de 2004.
- TAYLOR, D. J. Miscellaneous bacterial infections. In: STRAW, E. B.; D'ALLAIRE, S. MENGELING, W. L. (ed.) **Diseases of Swine**. 8ª ed Iowa: Iowa State University, cap. 44, p. 613 – 642, 1999.
- TENHAGEN, B.; FETSCH, A.; STÜHRENBERG, B.; SCHLEUTER, G.; GUERRA, B.; HAMMERL, J. A.; HERTWIG, S.; KOWALL, J.; KÄMPE, U.; SCHROETER, A.; BRÄUNIG, J.; KÄSBOHRER, A. Prevalence of MRSA types in slaughter pigs in different German abattoirs. **Veterinary Record**, v.165, p.589-593, 2009.

- TIWARI, H.K. & SEN, M.R..Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infectious Diseases**, v.6, n. 156, p.1-6, 2006.
- TOMASZ, A.; DRUGEON, H.B.; LENCASTRE, H. M.; JABES, D.; MCDOUGAL, L.; BILLE, J. New mechanism for methicillin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicilin-binding proteins with modified penicilin-binding capacity. **Antimicrob Agents Chemother**, v.33, p.1869-1874, 1989.
- TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**. Porto Alegre: Sulina, p. 263, 2012.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10<sup>a</sup> ed. – Porto Alegre, Artmed, 2012.
- TURUTOGLU, H.; ERCELİK, S.; OZTURK, D. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine mastitis. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, Pulawy, v. 50, p. 41-45, 2006.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5<sup>a</sup> edição. Editora Atheneu. p.760. São Paulo 2008.
- ULLAH,F.;MALIK,S.A.;AHMED,J.;ULLAH.F.;SHAH,S.M.;AYAZ,M.;HUSSAIN,S.; KHATO ON, L. Investigation of the Genetic Basis of Tetracycline Resistance in *Staphylococcus aureus* from Pakistan. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.11, n.06, p.925-931, 2012.
- USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/data/livestock-andpoultry-world-markets-andtrade>. Acesso em: 04 ago 2018.
- VAN CLEEF, B. A. G. L.; BROENS, E. M.; VOSS, A.; HUIJSDENS, X. W. High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 138, p. 756 – 763, 2010.
- VAZ, E. K. Resistencia antimicrobiana: como surge e o que representa para suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.37, supl.1, p. S147-S150, 2009.



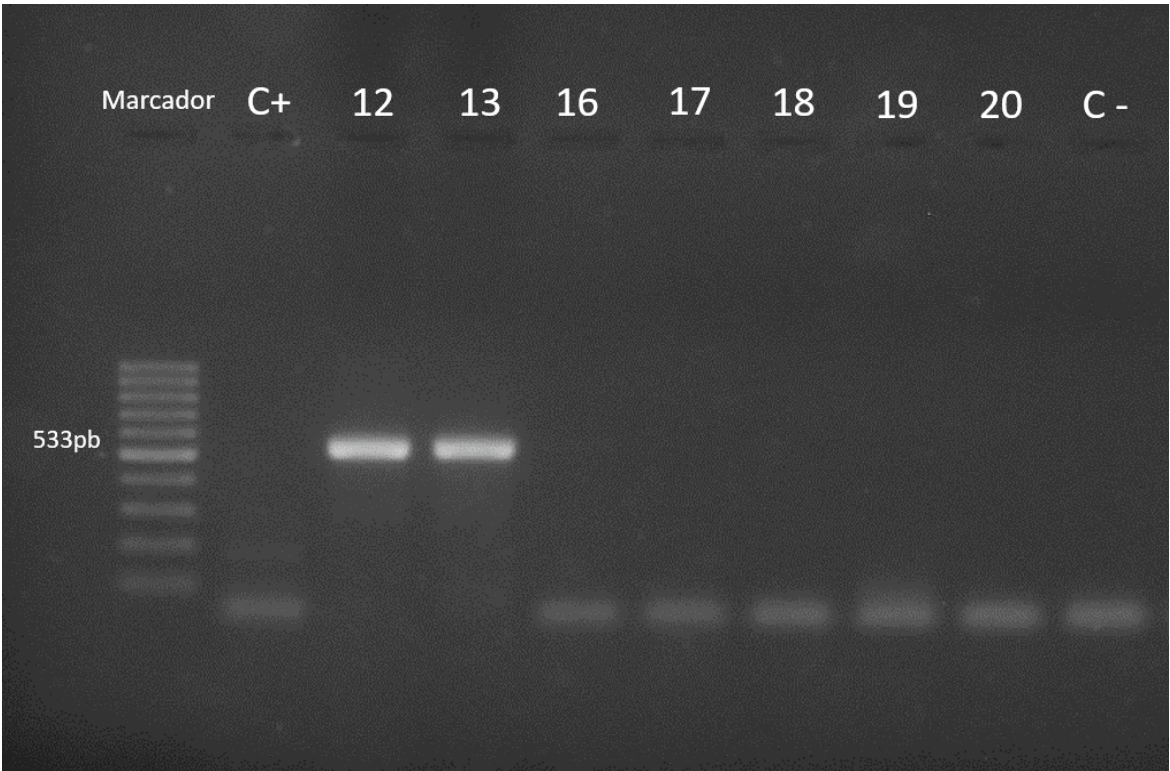
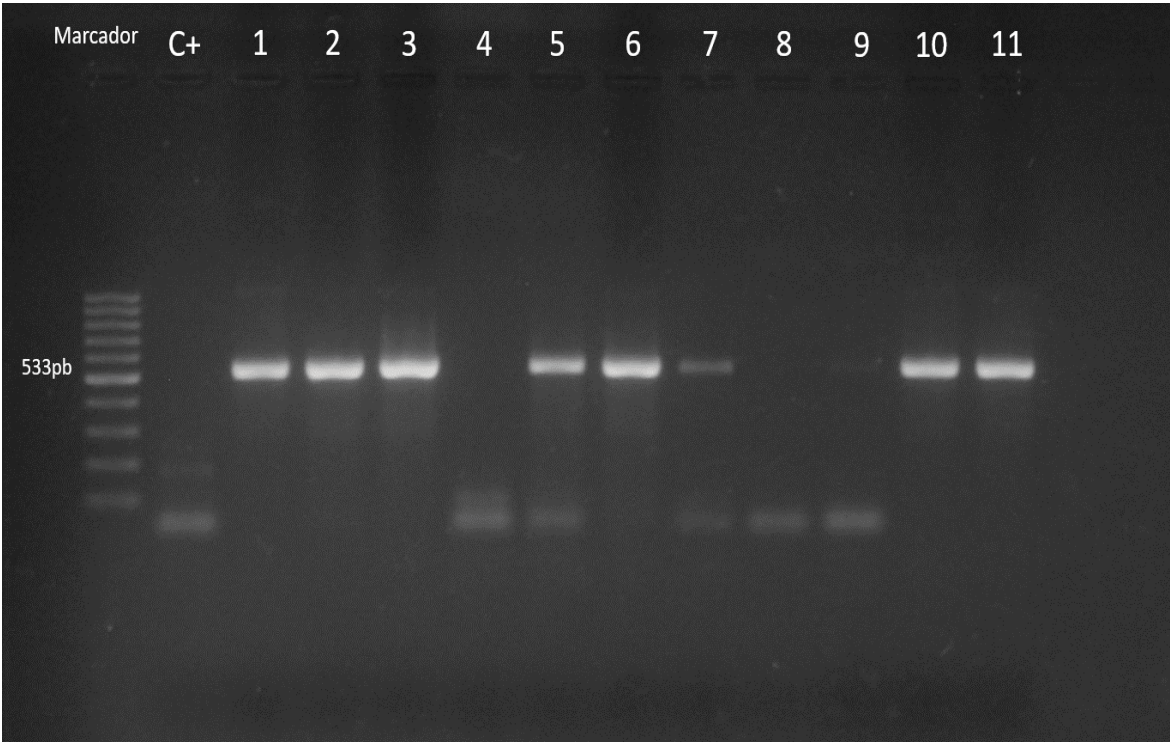
- VERKADE, E.; KLUYTMANS, J. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: Animal reservoirs and human infections. **Infection, Genetics and Evolution, Amsterdam**, v. 21, p. 523-530, 2014.
- VESTERHOLM-NIELSEN, M.; LARSEN, M. O.; OLSEN, J. E.; AARESTRUP, FRANK MOLLER. Occurrence of the blaZ gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 40, n. 3, p. 279-286, 1999.
- Von BAUM, H.; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 503–511, 2005.
- VRIES, L. E.; CHRISTENSEN, H.; SKOV, R. L.; AARESTRUP, F. M.; AGERSØ, Y. Diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, n.3, p.490-500, 2009.
- WALTHER, B.; WIELER, L. H.; FRIEDRICH, A. W.; HANSSEN, A. M.; KOHN, B.; BRUNNBERG, L.; BECKER, A, L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at university hospital during routine microbiological examinations. **Veterinary Microbiology, Amsterdam**, v.127, p.171-1178, 2008.
- WEESE, J. S.;ROUSSEAU, J.; DECKERT, A.; GOW, S.; REID-SMITH, R. J. *Clostridium difficile* and methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* shedding by slaughter - age pigs. **BMG Veterinary Research**, London, v.7 n .41, 2011.
- WIELDERS, A. L.C.; FLUIT, A. C.; BRISSE, S.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F. J. MecA gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 11, p. 3970-3975, 2002.
- WOODFORD, N.; MORRISON, D.; JOHNSON, A. P.; BRIANT, V.; GEORGE, R. C.; COOKSON, B. Application of DNA probes for Rna and vanA genes to investigation of a nosocomial cluster of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 653-658, 1993.
- WHO, World Health Organization. Antimicrobial Resistance. Disponível em:< <http://www.who.int/en/news-room/fact-heets/detail/antimicrobialresistance>>. Acesso em: 01 de outubro de 2018.



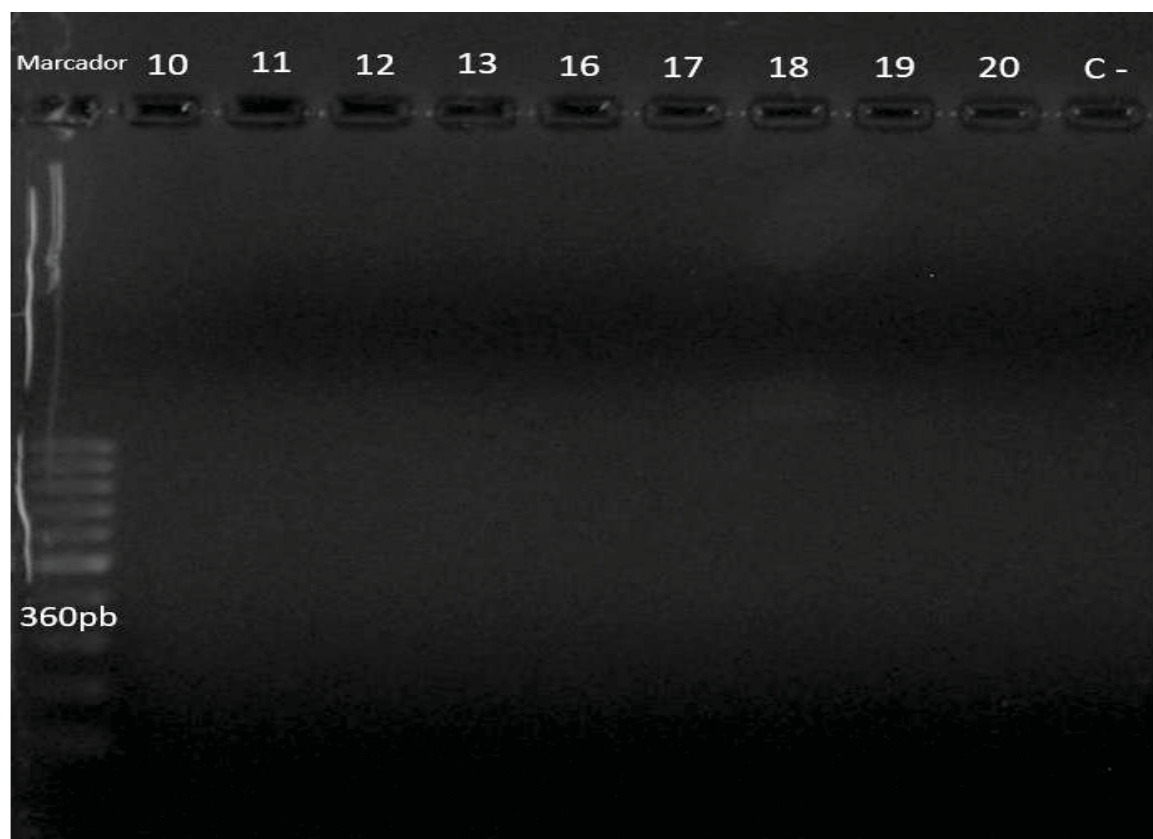
- ZELL, C. RESCH, M.; ROSENSTEIN, R.; ALBRECHT, T.; HERTEL, C.; GÖTZ, F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, n.3, p.246-251, 2008.
- ZOCHE, F.; SILVA, W. P. PCR para Detecção de *Staphylococcus aureus* enterotogênicos em queijo Minas frescal. **Alim. Nutr, Araraquara**, v. 23 p. 187-193, 2012.
- ZONG, Z., PENG, C., LU, X. Diversity of SCCmec elements in methicillinresistant coagulase-negative staphylococci clinical Isolates. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. 20191, 2011.

8 ANEXOS

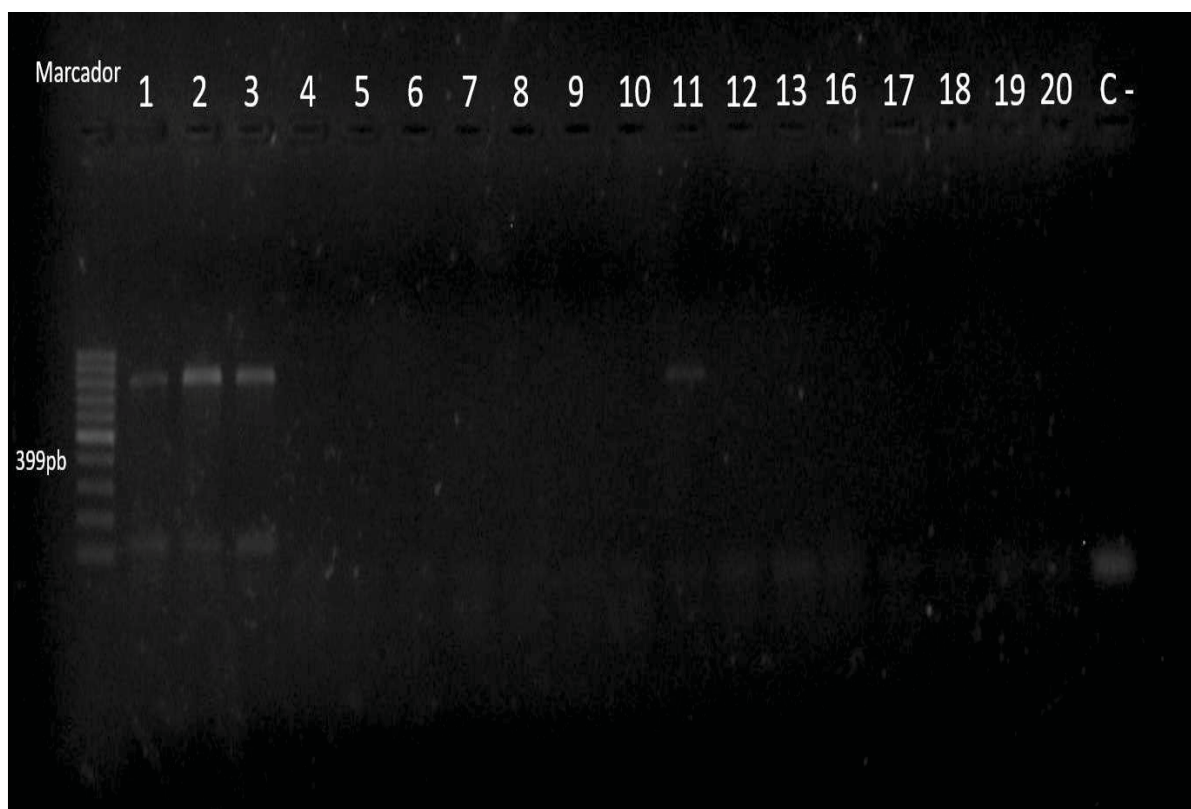
1 - Amplificação do gene *mecA* com produto de 533pb.



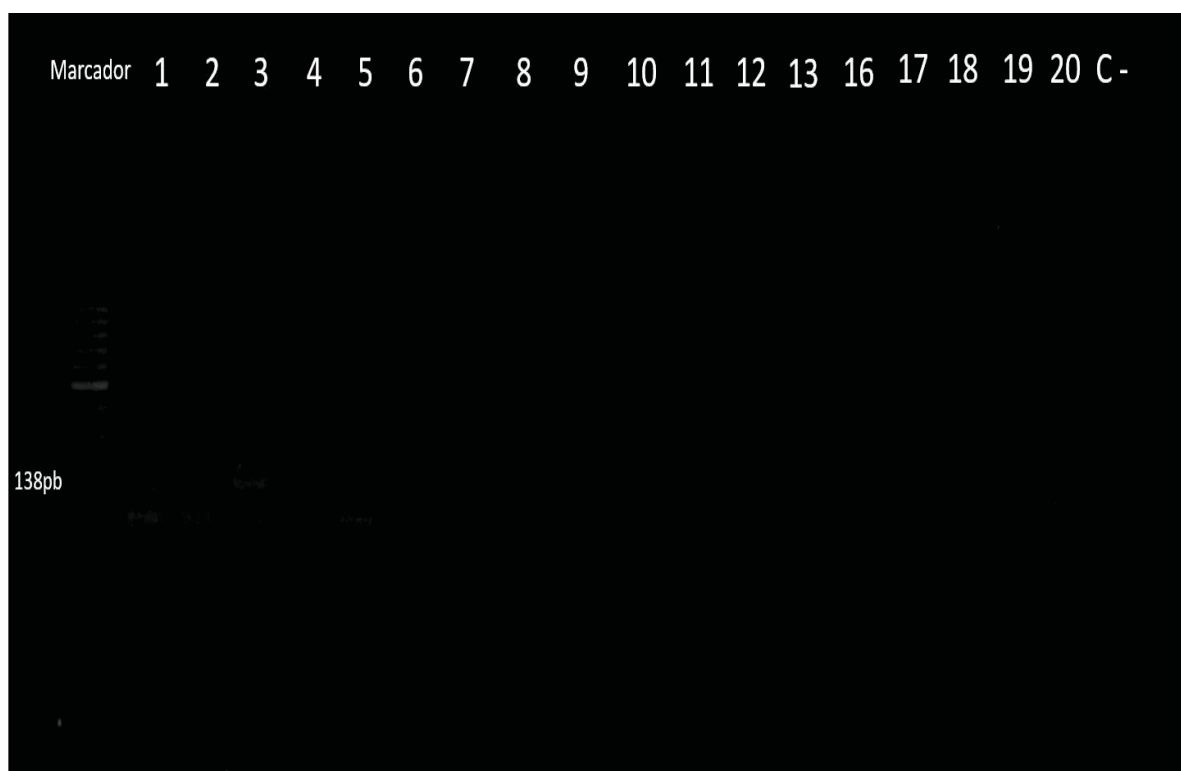
2 - Amplificação do gene *tetK* com produto de 360pb.



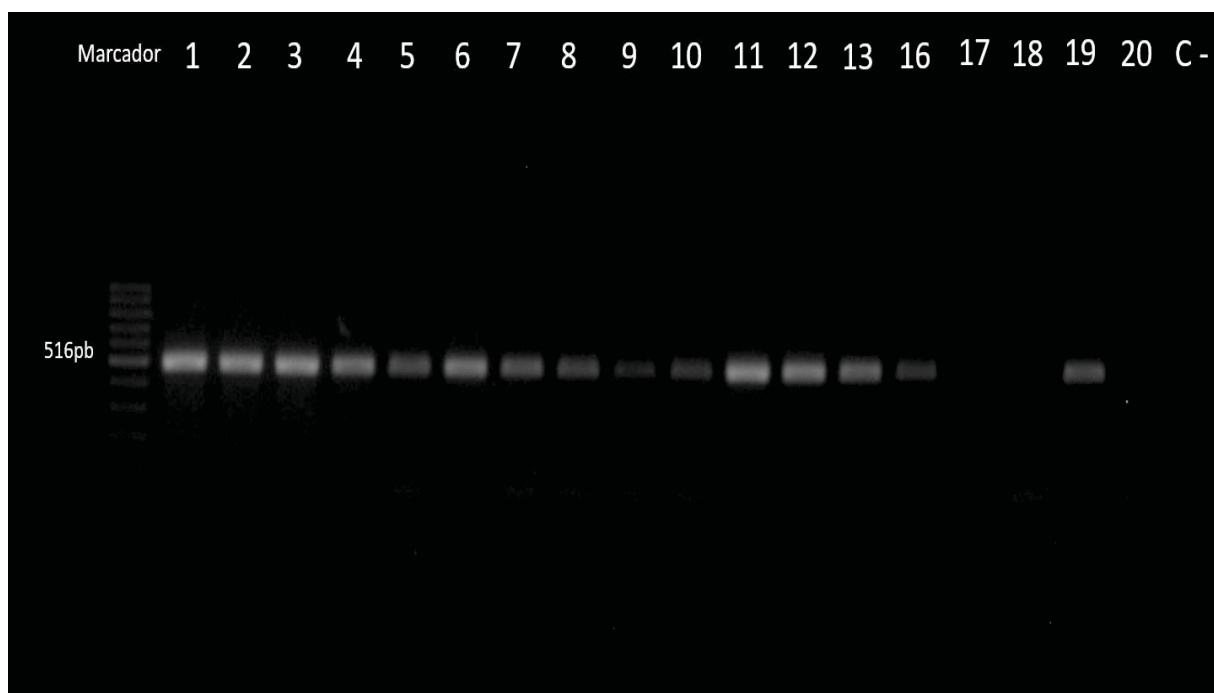
3 - Amplificação do gene *vanA* com produto de 399pb.



4 - Amplificação do gene *mecC* com produto de 138pb.



5 - Amplificação do gene *blaZ* com produto de 516pb.



6 - Amplificação do gene *femB* com produto de 651pb.

